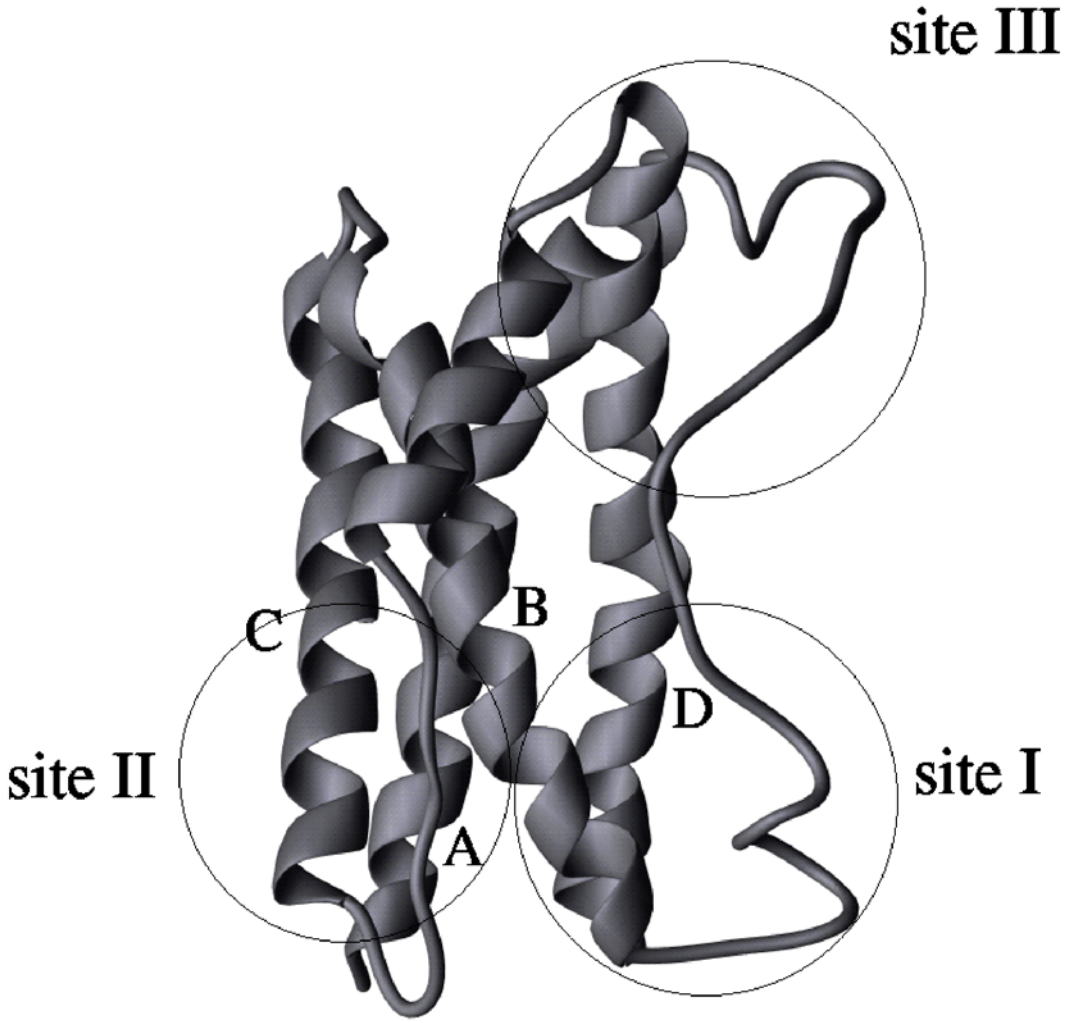
Biochemisches Institut der Christian-Albrechts-Universität

Biochemisches Praktikum



Dieses Skript finden Sie auch (inklusive der farbigen Abbildungen) auf der Internetseite des Biochemischen Institutes unter

www.uni-kiel.de/Biochemie/unterverzeichnisse/teaching/undergrdent/practical/main.html

Inhaltsverzeichnis

Biochemische Informatik 1

Nukleinsäuren 18

Proteine: Aufbau, Eigenschaften und Funktionen 50

Kohlenhydrate und Lipide: Aufbau, Eigenschaften und Funktionen 96

Blut: Hämoglobin, Eisenporphyrine, Eisenstoffwechsel,Blutgerinnung, glyciertes Hämoglobin 143

Leber und Leberstoffwechsel: Aminosäuren, Nukleotide, Hämoglobin, Cholesterin, Lipoproteine, Serum-Enzymdiagnostik173

Regulation des Stoffwechsels, Hormone 223

Biochemie des Immunsystems 264

Umgang mit Gefahrstoffen 291

Bedienungsanleitung für Eppendorf Pipetten 314

Gentechnologische Arbeiten 315

GEFAHREN UND GEFAHRENBEZEICHNUNG 315

SCHUTZMASSNAHMEN UND VERHALTENSREGELN 315

VERHALTEN IM GEFAHRFALL 315

ERSTE HILF 316

SACHGERECHTE ENTSORGUNG 316

BIOCHEMISCHES PRAKTIKUM I

Biochemische Informatik

Aufgabe 1: **Allgemeine Information zu Interleukin–6**

Aufgabe 2: **cDNA und Restriktionskarte von Interleukin-6**

Aufgabe 3: **Aminosäuresequenzen von Interleukin-6 und gp 130**

Aufgabe 4: **Sequenzvergleich verschiedener Insuline**

Aufgabe 5: **Polymerase-Ketten-Reaktion**

Aufgabe 6: **Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs)**

Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
Biochemisches Institut
In der Medizinischen Fakultät
Olshausenstrasse 40, 24098 Kiel

Stichworte

Datenbanken

- Allgemeine Informationen
- Literatur
- Sequenzdatenbanken
- Strukturdatenbanken

Sequenzanalyse

- DNA

  Humanes Genom, SNP’s, Krankheitsgene
- RNA

  cDNA, rekombinante Proteine, rekombinante Proteine
- Proteine

  Sequenzen, Strukturvorhersage, Tertiärstruktur

Primerdesign

PCR, Primerdesign, Schmelztemperatur eines Primerpaars

Einleitung

Datenbanken

a) Allgemeine Informationen

Die moderne Biochemie und Molekularbiologie kann auf immense Datenmengen zugreifen, die in verschiedenen Datenbanken niedergelegt sind. Daten können über das Internet über Stichwörter, Namen oder Zugangsnummern abgerufen werden. Diese Datenbanken müssen eingerichtet, organisiert und gepflegt werden. Darüber hinaus müssen diese Datenbanken täglich aktualisiert werden. Daher ist häufig die Benutzung von Online-Datenbanken mit Gebühren in oft nicht unerheblichem Ausmaß verbunden. Wir geben Ihnen im folgenden Adressen von Datenbanken, deren Nutzung umsonst ist, da sie von Universitäten oder nationalen Gesundheitseinrichtungen getragen werden. Hier können neueste Berichte über Forschungsergebnisse, DNA-Sequenzen, Protein-Sequenzen, Protein-Strukturen und vieles andere abgerufen werden. Diese Daten geben Wissenschaftlern, Ärzten und interessierten Laien die Möglichkeit, sich über Forschungsergebnisse zu informieren.

Literatur

Für die Biomedizinische Forschung wird die wichtigste Datenbank PubMed vom 'National Center for Biotechnology Information' bereitgestellt. Getragen wird die Datenbank vom amerikanischen 'National Institute of Health' sowie von der 'National Library of Medicine'.

Die Internetadresse ist: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/

Eine wichtige Unterabteilung dieser Sammlung von Datenbanken ist die Datenbank 'PubMed', die derzeit etwa 15.000.000 biomedizinische Zeitschriften-Zitationen aus mehr als 5000 Zeitschriften enthält.

Die Internetadresse ist: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=PubMed

In das Suchfeld dieser Datenbank kann man z.B. Autoren-Namen eingeben und erhält Informationen über erschienene Artikel in Fachzeitschriften. Diese Information geht mehrere Jahrzehnte zurück und wird täglich aktualisiert. Sie können sich also leicht ein Bild darüber machen, welcher Wissenschaftler auf welchem Gebiet forscht und wie produktiv er/sie publiziert.

Darüber hinaus kann man auch nach Begriffen suchen. Hier muss man eventuell eine Kombination von Begriffen eingeben, um eine überschaubare Anzahl von Treffern zu erzielen. Der Begriff 'Diabetis' erzielt zum Beispiel weit über 230.000 Treffer. Die Eingrenzung 'type I diabetes' liefert nur noch gute 40.000 Treffer. Eine weitere Eingrenzung auf 'type I diabetes insulin sensitivity' ergibt noch 1.000 Treffer usw. usw.

Sequenzdatenbanken

Nicht nur das humane Genom wurde vollständig sequenziert, auch das Genom anderer Organismen wurde inzwischen vollständig entschlüsselt oder ist zurzeit Gegenstand aktueller Sequenzierungen. Solche sehr aufwendigen Arbeiten werden immer von vielen Arbeitsgruppen aus aller Welt in enger Kooperation durchgeführt. Es gibt verschiedene Datenbanken in denen diese Ergebnisse bzw. Sequenzen zusammengeführt werden. Eine davon ist :

http://www.sanger.ac.uk/

Hier finden sie die vollständig sequenzierten Genome des Menschen, der Maus aber z.B. auch vom Zebrafisch und vielen anderen.

Andere Datenbanken enthalten die Aminosäuresequenzen der Proteine. Zugriff auf alle diese Datenbanken hat man über:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=search&DB=protein

Strukturdatenbanken

Die Funktion der Proteine ist unmittelbar mit ihrer dreidimensionalen Struktur verknüpft. Die Tertiärstruktur vieler Proteine ist bereits aufgeklärt worden. Diese Strukturen werden in der Protein Data Bank (PDB) gesammelt. Auf diese Datenbank haben sie Zugriff unter:

http://www.rcsb.org/pdb/

Dort können sie sich die Koordinaten der Protein- DNA- oder RNA-Strukturen herunterladen. Sie werden allerdings auch sehr viele Links zu anderen Datenbanken finden. So z.B. den Link zu

SCOP : Structural classification of Proteins

http://scop.berkeley.edu/

In dieser Datenbank sind die mehr als 10.000 bekannten Proteinstrukturen in ihre Superfamilien, Familien etc. gemäss ihrer Faltungstopologie eingeteilt.

Sequenzanalyse

DNA

Humanes Genom

Im Februar des Jahres 2001 wurde die erste Rohfassung der humanen DNA-Sequenz publiziert. Hierbei handelte es sich um die Ergebnisse zweier Sequenz-Projekte. Eines wurde mit öffentlichen Geldern finanziert während das andere von einer Firma organisiert und finanziert wurde. Es wurden ca 94% der humanen DNA-Sequenz bestimmt. Dies entspricht etwa 96% des Eu-Chromatins. Diese Gesamt-Sequenz deckt etwa 3.000.000.000 Basenpaare ab. Man geht heute davon aus, dass diese Sequenz für 25.000-30.000 Gene kodiert, von denen uns in ihrer Funktion etwa 30%-40% vollständig unbekannt sind. Das öffentlich geförderte humane Genomprojekt (HUGO) hat inzwischen alle Endfassungen der menschlichen Chromosomen 1 bis 22 sowie des Y- und des X-Chromosoms veröffentlicht.

Die Sequenz-Daten des humanen Genomprojektes sind online verfügbar und unter anderem innerhalb der Datenbank http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ abrufbar.

Single Nucleotide Polymorphisms (SNP's)

Eines der erstaunlichsten Ergebnisse des humanen Genomprojektes waren die hohen individuellen Unterschiede in der DNA-Sequenz. Es wurden schon bei der Veröffentlichung der Rohdaten des humanen Genomprojektes 1.500.000 sogenannte **S**ingle **N**ucleotide **P**olymorphism**s** (SNP's) kartiert, die sich gleichmäßig über das gesamte Genom erstrecken. Diese SNPs sind die molekulare Grundlage der

Unterschiede zwischen Individuen. Darüber hinaus können SNPs als genetische Marker verwendet werden, um sogenannte Krankheitsgene zu identifizieren.

Krankheitsgene

Krankheitsgene sind Gene, die in mutierter Form für den Ausbruch von verschiedenen Krankheiten verantwortlich sind. Hierbei sind Krankheitsgene zu nennen, die alleine für den Ausbruch oder den Verlauf von Krankheiten verantwortlich sind. Beispiele für solche Krankheiten sind die Sichelzellenanämie, die zystische Fibrose oder die Phenylketonurie. Wesentlich komplexer und schwieriger zu definieren sind Gruppen von Genvarianten, die zusammen für den Ausbruch oder den Verlauf von Krankheiten verantwortlich sind. Beispiel hierfür ist die entzündliche Darmerkrankung (Morbus Crohn). Mit den gleichmäßig über das gesamte Genom verteilten SNPs gibt es jetzt nach der Sequenzierung des humanen Genoms die Möglichkeit, Kopplungen zwischen einzelnen SNPs und der Segregation von Krankheiten zu identifizieren. Dies führt heutzutage zu einer vermehrten Identifizierung von neuen Krankheitsgenen. So wurde im März 2005 von der Kieler Arbeitsgruppe um Prof. Dr. S. Schreiber das Gen, das die Krankheit Sarkoidose (Morbus Boeck) verursacht, erkannt und in der renommierten Fachzeitschrift *Nature Genetics* publiziert. Ein weiteres Beispiel ist die Identifizierung des ATG16L1 Gens welches mit Morbus Crohn assoziiert ist (Hampe et al, Nature Genetics 2007).

Table 26 Disease genes positionally cloned using the draft genome sequence

Locus	Disorder	Reference(s)
BRCA2	Breast cancer susceptibility	55
AIRE	Autoimmune polyglandular syndrome type 1 (APS1 or APECED)	389
PEX1	Peroxisome biogenesis disorder	390, 391
PDS	Pendred syndrome	392
XLP	X-linked lymphoproliferative disease	393
DFNA5	Nonsyndromic deafness	394
ATP2A2	Darier's disease	395
SEDL	X-linked spondyloepiphyseal dysplasia tarda	396
WISP3	Progressive pseudorheumatoid dysplasia	397
CCM1	Cerebral cavernous malformations	398, 399
COL11A2/DFNA13	Nonsyndromic deafness	400
LGMD 2G	Limb-girdle muscular dystrophy	401
EVC	Ellis-Van Creveld syndrome, Weyer's acrodental dysostosis	402
ACTN4	Familial focal segmental glomerulosclerosis	403
SCN1A	Generalized epilepsy with febrile seizures plus type 2	404
AASS	Familial hyperlysinaemia	405
NDRG1	Hereditary motor and sensory neuropathy-Lom	406
CNGB3	Total colour-blindness	407, 408
MUL	Mulibrey nanism	409
USH1C	Usher type 1C	410, 411
MYH9	May-Hegglin anomaly	412, 413
PRKAR1A	Carney's complex	414
MYH9	Nonsyndromic hereditary deafness DFNA17	415
SCA10	Spinocerebellar ataxia type 10	416
OPA1	Optic atrophy	417
XLCSNB	X-linked congenital stationary night blindness	418
FGF23	Hypophosphataemic rickets	419
GAN	Giant axonal neuropathy	420
AAAS	Triple-A syndrome	421
HSPG2	Schwartz-Jampel syndrome	422

Tabelle aus der Originalarbeit, in der die Rohfassung des humanen Genoms veröffentlicht wurde (*Nature* 409: 860-921, 2001). Auch die Referenzen beziehen sich auf die Zitate in dieser Arbeit.

RNA

Komplementäre DNAs (cDNAs)

Das retrovirale Enzym Reverse Transkriptase schreibt RNA in komplementäre DNA-Sequenzen um. Verwendet man dieses Enzym, um reife mRNA-Moleküle in entsprechende doppelsträngige DNA-Sequenzen umzuschreiben, erhält man cDNAs. Diese entsprechen also in ihrer Sequenz reifen mRNAs. Solche cDNAs haben den Vorteil, dass man sie wie andere DNA-Moleküle verändern bzw. rekombinieren kann. Da cDNAs in der Regel für ein Protein kodieren, kann man cDNAs verwenden, um Proteine in Bakterien, Hefen oder Säugetierzellen rekombinant zu exprimieren. Heutzutage werden die meisten therapeutischen Proteine rekombinant hergestellt. Beispiele sind humanes Insulin, Erythropoetin, Faktor VIII-Protein, Granulozyten-Colony-Stimulating-Factor (G-CSF) und löslicher Tumornekrosisfaktor-Rezeptor. Diese Proteine sind heute vielfach verabreichte Therapeutika.

Rekombinante Proteine

Wie oben bereits erwähnt lassen sich. humane Proteine auch in anderen Organismen exprimieren. Dazu werden sehr häufig Bakterien oder auch Hefen verwendet. Die untenstehende Tabelle gibt einen Überblick über therapeutisch eingesetzte Proteine, die in Hefen produziert werden.

Table 1 Therapeutic proteins produced in the yeasts *S. cerevisiae* and *P. pastoris*

Products on the market

Commercial name	Recombinant protein	Company	Expression system
Actrapid	Insulin	NovoNordisk	*S. cerevisiae*
Ambirix	Hepatitis B surface antigen	GlaxoSmithKline	*S. cerevisiae*
Comvax	Hepatitis B surface antigen	Merck	*S. cerevisiae*
Elitex	Urate oxidase	Sanofi-Synthelabo	*S. cerevisiae*
Glucagen	Glucagon	Novo Nordisk	*S. cerevisiae*
HBVAXPRO	Hepatitis B surface antigen	Aventis Pharma	*S. cerevisiae*
Hexavac	Hepatitis B surface antigen	Aventis Pasteur	*S. cerevisiae*
Infanrix-Penta	Hepatitis B surface antigen	GlaxoSmithKline	*S. cerevisiae*
Leukine	Granulocyte-macrophage colony stimulating factor	Berlex	*S. cerevisiae*
Novolog	Insulin	Novo Nordisk	*S. cerevisiae*
Pediarix	Hepatitis B surface antigen	GlaxoSmithKline	*S. cerevisiae*
Procomvax	Hepatitis B surface antigen	Aventis Pasteur	*S. cerevisiae*
Refludan	Hirudin/lepirudin	Hoechst	*S. cerevisiae*
Regranex rh	Platelet-derived growth factor	Ortho-McNeil Phama (US), Janssen-Cilag (EU)	*S. cerevisiae*
Revasc	Hirudin/desirudin	Aventis	*S. cerevisiae*
Twinrix	Hepatitis B surface antigen	GlaxoSmithKline	*S. cerevisiae*

Products under development

Protein	Indication	Company	Expression system
Angiostatin	Antiangiogenic factor	EntreMed	*P. pastoris*
Elastase inhibitor	Cystic fibrosis	Dyax	*P. pastoris*
Endostatin	Antiangiogenic factor	EntreMed	*P. pastoris*
Epidermal growth factor analog	Diabetes	Transition Therapeutics	*P. pastoris*
Insulin-like growth factor-1	Insulin-like growth factor-1 deficiency	Cephalon	*P. pastoris*
Human serum albumin	Stabilizing blood volume in burns/shock	Mitsubishi Pharma (formerly Welfide)	*P. pastoris*
Kallikrein inhibitor	Hereditary angiodema	Dyax	*P. pastoris*

Includes approved products and those in clinical development. Sources: (G. Walsh, 2003)[1] or personal communication.

Proteine

Sequenzen

Primärstrukturen (Aminosäuresequenzen) finden sie am Besten in der bereits oben beschriebenen Datenbank

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=search&DB=protein

Neben der Primärstruktur erhalten sie dort allerdings noch viele andere Informationen über das Protein, z.B. ob es potentielle Glykosylierungstellen besitzt, aus wie vielen und welchen Domänen es besteht, wer es zuerst beschrieben hat und vieles mehr.

Sekundärstrukturvorhersage

Aus der Primärstruktur lässt sich die Sekundärstruktur eines Proteins vorhersagen. Diese Vorhersage beruht auf empirischen Daten. Hierbei wurden die Häufigkeiten einer Aminosäure bestimmt mit der sie in bekannten Tertiärstrukturen innerhalb eines Sekundärstrukturelementes vorkommt. Die unten stehende Tabelle zeigt eine ganze Reihe solcher Verfahren.

Ansätze zur Sekundärstrukturvorhersage

Jahr	Name	Güte	Bemerkungen
70er	Chou-Fasman	~ 54 %	Statistische Analyse
1988	Quian + Sejnowski	~ 62 %	Einschichtiges Feedforward-Netz
1993	Rost (PHD)	~ 72 %	Kombination von zwei Feedforward-Netzen
1996	Riis + Krogh	~ 72 %	Netzwerk-Ensembles für α, β und coils
1999	Baldi (BRNN)	~ 73 %	Kombination von rückgekoppelten Netzen
1999	Jones (PSIRED)	~ 77 %	Besonderes Sequenzalignment-Verfahren, gute Kreuzvalidierungsmethode

Die einfachste Methode ist die von Chou und Fasman entwickelte statistische Analyse. Jeder Aminosäure wird dabei eine Wahrscheinlichkeit zugeordnet mit der man sie in einer Helix, einem β-sheet oder einem turn findet.

Residue	helix	ß-sheet	turns
Glu	1.59	0.52	1.01
Ala	1.41	0.72	0.82
Leu	1.34	1.22	0.57
Met	1.30	1.14	0.52
Gln	1.27	0.98	0.84
Lys	1.23	0.69	1.07
Arg	1.21	0.84	0.90
His	1.01	0.80	0.81
Val	0.90	1.87	0.41
Ile	1.09	1.67	0.47
Tyr	0.74	1.45	0.76
Cys	0.66	1.40	0.54
Trp	1.02	1.35	0.65
Phe	1.16	1.33	0.59
Thr	0.76	1.17	0.90
Gly	0.43	0.58	1.77
Asn	0.76	0.48	1.34
Pro	0.34	0.31	1.32
Ser	0.57	0.96	1.22
Asp	0.99	0.39	1.24

Ist dieser Wert > 1.0 findet man diese Aminosäure bevorzugt in dem entsprechenden Sekundärstrukturelement. So findet man z.B. die Aminosäuren Glu, Ala, Leu, Met, Gln, Lys, Arg und His bevorzugt in Helices (siehe nebenstehende Tabelle). So kann jeder Aminosäure in einer Sequenz ein Sekundärstrukturelement zugeordnet werden. Besitzen nun z.B. mehrere aufeinanderfolgende Aminosäuren das gleiche Sekundärstrukturelement (z.B. H für Helix), ist es sehr wahrscheinlich, dass diese Sequenz eine helikale Struktur einnimmt (siehe unten).

EALMQGPSVIY

HHHHHTTTBBB

Im Laufe der Jahre sind immer kompliziertere Algorithmen auf der Grundlage dieser empirisch ermittelten Wahrscheinlichkeiten entwickelt worden.

Tertiärstrukturvorhersage

Zur Vorhersage der Tertiärstruktur eines Proteins sind in den letzten 10 Jahren eine Reihe von Methoden entwickelt worden. Deren Besprechung würde den Rahmen dieses Skriptes sprengen. Erwähnt sei lediglich die Methode des *molecular modelling.* Diese Methode setzt voraus, dass die Struktur eines homologen Proteins bereits bekannt ist. Zunächst werden die Sequenzen der beiden Proteine (mit bekannter bzw. unbekannter Struktur) verglichen, es wird ein sogenanntes *Alignment* angefertigt. Dieses kann auch aus mehreren Sequenzen der gleichen Proteinfamilie bestehen (siehe unten, ein *Alignment* des Interleukin-6 von verschiedenen Species).

```
  1 MNSRFTSAFTPFAVSLGLLLVMTSAFPTPGPLGEDFKNDTTPGRLLLTTPEKTEALIKRM il6_bovin.sw
  1 MNSFSTSAFGPVAFSLGLLLVLPAAFPAPVPPGEDSKDVAAPHRQPLTSSERIDKQIRYI il6_human.sw
  1 MKFLSARDFHPVAF-LGLMLVTTTAFPTSQVRRGDFTEDTTPNRPVYTTSQ-VGGLITHV il6_mouse.sw
  1 MNSLSTSAFSPVAFSLGLLLVMATAFPTPGRLEEDAKGDATSDKMLFTSPDKTEELIKYI il6_pig.sw
  1 MKFLSARDFQPVAF-LGLMLLTATAFPTSQVRRGDFTEDTTHNRPVYTTSQ-VGGLITYV il6_rat.sw
  1 MNSLFTSAFSPLAVSLGLLLVMTSAFPTPGPLGEDFKNDTTPSRLLLTTPEKTEALIKHI il6_sheep.sw
    *.......* *.*..***.*.   ***..    .*.. .... .   *.      .*

 61 VDKISAMRKEICEKNDECESSKETLAENKLNLPKMEEKDGCFQSGFNQAICLIRTTAGLL il6_bovin.sw
 61 LDGISALRKETCNKSNMCESSKEALAENNLNLPKMAEKDGCFQSGFNEETCLVKIITGLL il6_human.sw
 59 LWEIVEMRKELCNGNSDCMNNDDALAENNLKLPEIQRNDGCYQTGYNQEICLLKISSGLL il6_mouse.sw
 61 LGKISAMRKEMCEKYEKCENSKEVLAENNLNLPKMAEKDGCFQSGFNQETCLMRITTGLV il6_pig.sw
 59 LREILEMRKELCNGNSDCMNSDDALSENNLKLPEIQRNDGCFQTGYNQEICLLKICSGLL il6_rat.sw
 61 VDKISAIRKEICEKNDECENSKETLAENKLKLPKMEEKDGCFQSGFNQAICLIKTTAGLL il6_sheep.sw
    .  *...*** * ..  *..... *.**.* **.. ..***.*.*.*...** ..  **.

121 EYQIYLDYLQNEY-EGNQENVRDLRKNIRTLIQILKQKIADL----ITTPATNTDLLEKM il6_bovin.sw
121 EFEVYLEYLQNRF-ESSEEQARAVQMSTKVLIQFLQKKAKNLDAITTPDPTTNASLLTKL il6_human.sw
119 EYHSYLEYMKNNLKDNKKDKARVLQRDTETLIHIFNQEVKDLHKIVLPTPISNALLTDKL il6_mouse.sw
121 EFQIYLDYLQKEY-ESNKGNVEAVQISTKALIQTLRQKGKNPDKATTPNPTTNAGLLDKL il6_pig.sw
119 EFRFYLEFVKNNLQDNKKDKARVIQSNTETLVHIFKQEIKDSYKIVLPTPTSNALLMEKL il6_rat.sw
121 EYQIYLDFLQNEF-EGNQETVMELQSSIRTLIQILKEKIAGL----ITTPATHTDMLEKM il6_sheep.sw
          *   ** ....   .      .  .  . .*.... .. . .     ..* ... .. *.

176 QSSNEWVKNAKIILILRNLENFLQFSLRAIRMK                          il6_bovin.sw
180 QAQNQWLQDMTTHLILRSFKEFLQSSLRALRQM                          il6_human.sw
179 ESQKEWLRTKTIQFILKSLEEFLKVTLRSTRQT                          il6_mouse.sw
180 QSQNEWMKNTKIILILRSLEDFLQFSLRAIRIM                          il6_pig.sw
179 ESQKEWLRTKTIQLILKALEEFLKVTMRSTRQT                          il6_rat.sw
176 QSSNEWVKNAKVIIILRSLENFLQFSLRAIRMK                          il6_sheep.sw
```

. . . . .* . .**. . . . **. ..*. *

Da die dreidimensionale Struktur des humanen IL-6 bekannt ist, kann man mit dessen Hilfe ein dreidimensionales Modell für die anderen Moleküle erstellen, indem die einzelnen Aminosäuren, gemäss dem obigen *alignment*, ausgetauscht werden.

Ein einfaches Programm zum Anschauen von Proteinstrukturen ist das Programm 'rasmol', das man sich von der Adresse: http://www.umass.edu/microbio/rasmol/ herunterladen kann. Man kann sich mit diesem Programm Strukturen ansehen, einzelne Aminosäuren markieren, das Protein am Bildschirm drehen und vieles mehr.

Primerdesign

Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR ist eine *in vitro* Methode zur enzymatischen Amplifikation spezifischer DNA-Segmente. Sie ermöglicht die selektive Vervielfältigung der DNA-Matrize auch aus einem komplexen Gemisch heraus. Man kann also ein einziges Molekül amplifizieren. Die Reaktion basiert auf der Anlagerung (Annealing) und Verlängerung (Extension) zweier Oligonukleotidprimer, die entgegengesetzt die Zielregion in einer Duplex-DNA flankieren. Die Reaktion besteht aus aufeinanderfolgenden Amplifikationszyklen, die jeweils durch drei Phasen unterschiedlicher Temperatur charakterisiert sind. In der ersten Phase, der Denaturierungsphase, wird die doppelsträngige DNA durch Erhitzen in einzelsträngige DNA überführt. Durch das anschließende Absenken der Temperatur in der Annealingphase kommt es zur Hybridisierung (Anlagerung) der Oligonukleotidprimer an die komplementären Zielregionen der denaturierten Matrizen-DNA. In der Extensionsphase werden die Primer durch eine thermostabile DNA-Polymerase bei hoher Temperatur, zur Verminderung unspezifischer Primerhybridisierung, komplementär zur Matrize verlängert. In den aufeinanderfolgenden Amplilfikationszyklen kommt es zur Akkumulation der durch die beiden Primer flankierten DNA-Sequenz.

Die PCR-Bedingungen müssen je nach Länge der zu amplifizierenden Sequenz und Länge und G/C-Gehalt der spezifischen Primer individuell angepasst werden.

Wir haben Ihnen eine kurze Animation auf Ihren Computer geladen, die sehr anschaulich die Prinzipien der PCR erklärt.

Primerdesign

Generell sollten Primer für Sequenzierungs- oder Screeningaufgaben folgende Voraussetzungen möglichst gut erfüllen:

- 18 -25 Nukleotide lang, bei kürzeren Primern steigt die Gefahr sekundärer Bindungsstellen
- Primer mit mehr als 3- bis 4-facher Abfolge einer Base ("Base-Runs") sind zu vermeiden
- "Melting temperature" möglichst 52°C bis 58°C (Berechnung siehe Formel)
- Möglichst Base G oder C am 3´ Ende, die sechs 3´ terminalen Basen sollten ein ausgeglichenes GC/AT-Verhältnis aufweisen
- Der GC-Gehalt sollte zwischen 40 und 60 % liegen. Bei geringerem GC-Gehalt eventuell den Primer verlängern, um die Schmelztemperatur zu erhöhen
- Keine Hairpin-loops (Komplementäre Rückfaltung)
- Keine Palindrome (z.B. 5´-AAG-CTT-3´)
- Primer-Dimer Bildung sollte ausgeschlossen werden
- Kritische Endkontrolle, ob Primer und Bindungsstelle auch tatsächlich zueinander passen.

Internetlinksammlung zum Erstellen und Überprüfen von Primern:

Internetlinksammlung zum Erstellen und Überprüfen von Primern:

http://www.science.co.il/Biomedical/Primer-Tools.asp

Erstellen von Primern:

http://frodo.wi.mit.edu/primer3/

Schmelztemperatur eines Primerpaars

Die Schmelztemperatur T_M eines Oligonukleotids/Primers kann nach einer empirischen Formel, die sowohl den relativen G/C-Gehalt (% GC) als auch die Länge der Oligonukleotide berücksichtigt, berechnet werden:

$$T_M\,[°C] = 69{,}3 + 0{,}41 \times (\%GC) - \frac{650}{n}$$

n: Länge des Oligonukleotids

Die optimale Annealing-Temperatur T_A für eine Polymerasekettenreaktion berechnet sich nach

$$T_A = \frac{TM1 + TM2}{2} - 3°C$$

Wobei T_{M1} und T_{M2} die Schmelztemperaturen der beiden Primer sind.

Nützliche Adressen:

NCBI:	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
NCBI-PubMed:	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=PubMed
Google:	http://www.google.de/
Google-Scholar:	http://scholar.google.com/
Expasy-Proteomics:	http://www.expasy.org/tools/
Molecular Biology Tools:	http://www.biophys.uni-duesseldorf.de/local/BioInfo.html
Protein Tools:	http://www.scripps.edu/~cdputnam/protcalc.html
Genome	http://www.sanger.ac.uk/
Proteinstrukturen	http://www.rcsb.org/pdb/
Strukturelle Klassif.	http://scop.berkeley.edu/

Aufgabe 1: Allgemeine Information zu Interleukin–6

Bitte finden Sie einschlägige Informationen über das Zytokin Interleukin-6 und den gp130-Rezeptor (jeweils eine halbe Seite) mit Hilfe von Datenbanken (s.o.). Gefragt sind Informationen wie Stoffklasse, Expressionsprofile, Krankheitsbezug etc....

Aufgabe 2: cDNA und Restriktionskarte von Interleukin-6

Wie lautet die Sequenz der mRNA für humanes Interleukin-6 und den humanen gp130-Rezeptor?

a) Konstruieren Sie eine Restriktionskarte für die entsprechenden cDNAs (was ist eine cDNA?) Verwenden sie dazu bitte das Programm pDRAW32
b) Wie würden Sie die Interleukin-6 cDNA in Bakterien oder in Säugetierzellen exprimieren? Worauf muss man achten? Welche genetischen Elemente braucht man?
c) Wer hat die Ratten Insulin cDNA (rat insulin gene) zuerst kloniert? Wann war das? Welche Position hat diese Person heute?

Aufgabe 3: Aminosäuresequenzen von Interleukin-6 und gp 130

Stellen Sie die Aminosäuresequenz von humanem Interleukin-6 und humanem gp130 im 1-Buchstaben Code dar.

a) Welches Molekulargewicht hat das Protein Interleukin-6 und der gp130-Rezeptor?
b) Wie sieht die Hydrophobizität aus?
c) Bestimmen Sie den isoelektrischen Punkt (was ist das?).
d) Finden Sie ein Bild mit der dreidimensionalen Proteinstruktur von Interleukin-6.
e) Identifizieren Sie hydrophile und hydrophobe Aminosäuren. (RASMOL)

Aufgabe 4: Sequenzvergleich verschiedener Insuline

Vergleichen Sie die Proteinsequenzen von Insulin von Mensch, Schwein, Maus und Huhns.

a.) Fertigen sie ein Alignment an. (Schriftart: Courier)
b.) Identifizieren Sie die Unterschiede zwischen menschlichem und Schweineinsulin in der Proteinstruktur.

Aufgabe 5: Polymerase-Ketten-Reaktion

Entwerfen Sie jeweils ein Primer-Paar für eine Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) für humanes Interleukin-6.

a) Entwerfen Sie ein Primer-Paar für die Detektion von genomischer Interleukin-6 DNA.
b) Entwerfen Sie ein Primer-Paar für die Detektion von Interleukin-6 mRNA mittels Reverser Transkriptase- PCR (RT-PCR).

Aufgabe 6: Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs)

Gibt es 'Single Nucleotide Polymorphisms' (SNPs) im menschlichen Interleukin-6 bzw. gp130-Rezeptor-Gen?

a) Wurden solche SNPs bereits mit Krankheiten assoziiert?
b) Wieviel SNPs sind in diesem Gen bekannt?
c) Worin liegt die besondere Bedeutung von SNPs für die Identifizierung von Krankheitsgenen?

BIOCHEMISCHES PRAKTIKUM II

Nukleinsäuren

Aufgabe 1: **UV-Spektrum von Nukleotiden**

Aufgabe 2: **Wärmedenaturierung von nativer DNA**

Aufgabe 3: **Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Aufgabe 4: **Restriktionsverdau von Plasmid-DNA und Größenbestimmung von DNA Fragmenten durch Agarosegelelektrophorese**

Aufgabe 5: **Transformation von Bakterien mit einem Interleukin-6 Expressionsplasmid**

Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
Biochemisches Institut
In der Medizinischen Fakultät
Olshausenstrasse 40, 24098 Kiel

Stichworte – Vorausgesetztes Wissen

- Bausteine der Nukleinsäuren
- Arten von Nukleinsäuren
- Primär-, Sekundär-, Tertiärstruktur der Nukleinsäuren
- Trennung von Nukleinsäuren nach Molekülgröße und Struktur
- Schmelzen und Re-Assoziation von DNA
- Photometrie
- Elektrophorese (Agarosegel)
- Restriktionsverdau von DNA
- Amplifikation von DNA mit Hilfe der Polymerase-Kettenrreaktion
- Transformation von Bakterien

Einleitung

Nukleinsäuren

Grundsätzlich unterscheidet man zwei Klassen von Nukleinsäuren: Desoxyribonukleinsäure (DNA) und Ribonukleinsäure (RNA). Beides sind Nukleotid-Polymere, die als RNA Ribose- oder als DNA Desoxyribose-Reste enthalten; diese sind durch 3`→ 5`- Phosophodiesterbindungen verknüpft.

Raumstruktur von Nukleinsäuren

Die biologische Funktion der Nukleinsäuren beruht weitgehend auf ihrer Fähigkeit, durch paarweise Zusammenlagerung ihrer Basen Sekundär- (und Tertiär-) Strukturen zu bilden. Hierbei bilden sich zwischen den Basen G und C drei Wasserstoffbrücken (H-Brücken) aus, zwischen A und T bzw. A und U zwei H-Brücken. Die Bindung G ≡ C ist etwas fester als die Bindung A = T (A = U). Während RNA durch derartige Basenpaarung z.T. komplizierte, individuelle Konformationen – analog den Proteinen – bildet (bekannt besonders von der transfer-RNA), liegt native DNA fast ausschließlich als reguläre, hochmolekulare Doppelhelix aus zwei antiparallel angeordneten DNA-Strängen vor, deren Basensequenzen einander „komplementär“ sind.

Die physikalisch-chemischen Eigenschaften von DNA in wässeriger Lösung erklären sich weitgehend aus der helikalen Sekundärstruktur: die gute Wasserlöslichkeit (der Umfang der Helix ist von Zucker- und Phosphatresten besetzt), die Rigidität der Moleküle und ihre Empfindlichkeit gegen Scherkräfte (im Innern der Helix sind die Basen stapelartig dicht übereinandergeschichtet)[1], die im Vergleich zur globulär aufgeknäuelten RNA oder Einstrang-DNA geringere Dichte u.a.m.

Bei Erhitzung wässeriger Nukleinsäurelösungen werden die H-Brücken aufgebrochen, die komplementären Stränge trennen sich, die Nukleinsäure wird denaturiert; sie „schmilzt“. Durch die Auflösung der Sekundärstruktur ändern sich bei

[1] Zwischen den Ebenen benachbarter Basen treten dabei Attraktionskräfte auf, sog. Stapelkräfte (engl. stacking). G-C aufgrund seiner drei Wasserstoffbrücken trägt zum „stacking“ erheblich mehr bei als A-T mit nur zwei Wasserstoffbrücken.

DNA alle oben aufgezählten Eigenschaften sprunghaft. Zur experimentellen Verfolgung des „Schmelzens“ eignet sich am besten der sogenannte hyperchrome Effekt, d.h. der Anstieg des Extinktionskoeffizienten (gewöhnlich bei 260 nm gemessen) bei Denaturierung. Der hyperchrome Effekt ist in etwa proportional dem Gehalt an AT-Paaren, der zwischen 20% und 50% beträgt.

Das „Schmelzen“ erfolgt bei DNA in einem relativ engen Temperaturbereich. Die Temperatur halbmaximaler Extinktionszunahme wird als der Schmelzpunkt (T_m) des DNA-Präparates bezeichnet. Die Schmelztemperatur T_m steigt

a) mit dem GC-Gehalt der DNA, und

b) mit der Ionenstärke der Lösung.

Langsame Abkühlung einer denaturierten DNA-Lösung führt bei ausreichender Ionenstärke zu relativ weitgehender Rückpaarung (Reassoziation) der komplementären Stränge, rasche Abkühlung nicht. Je mehr identische („repetierende“) Sequenzen eine DNA enthält, desto schneller reassoziiert sie.

Physikalische Grundlagen zur Photometrie

Das Prinzip der Photometrie beruht auf der Tatsache, dass Licht von bestimmten Stoffen entweder emittiert (Emissions-Flammenphotometrie) oder abgeschwächt (Absorptionsphotometrie) werden kann und dass eine Proportionalität zwischen der Konzentration dieser Stoffe und der Lichtemission bzw. -absorption besteht. Daher lässt sich über die Messung der Lichtintensität mit Hilfe von Photozellen in einfacher Weise eine Konzentrationsbestimmung durchführen.

Photometrische Verfahren auf der Basis der Absorptions-Photometrie spielen heute in der modernen biochemischen und klinisch-chemischen Analytik eine überragende Rolle. Da sich diese Methode leicht automatisieren lässt, ist sie nicht nur für manuelle Einzelbestimmungen wertvoll, sondern findet auch bei den großen Analyseautomaten (z.B. Aminosäure-Analysator) Verwendung.

Da die Lichtabsorption einer Lösung durch die einzelnen Moleküle des gelösten absorbierenden Stoffes bewirkt wird, ist die Gesamtabsorption von der Konzentration dieser Moleküle abhängig. Wird ein einfallender Lichtstrahl der Intensität I_0 durch eine Lösung der Konzentration c_1 bis auf $I_D = I_0/2$ abgeschwächt, so wird er durch die Konzentration

$$c_2 = 2 \cdot c_1 \quad \text{auf} \quad I_D = 0{,}5 \cdot 0{,}5 \cdot I_0 = \frac{I_0}{4}$$

und durch

$$c_3 = 3 \cdot c_1 \quad \text{auf} \quad I_D = 0{,}5 \cdot 0{,}5 \cdot 0{,}5 \cdot I_0 = \frac{I_0}{8}$$

reduziert. Mit linear ansteigender Konzentration der Lösung fällt also die Intensität I_D des austretenden Lichtstrahls exponentiell ab.

$$I_D \sim I_0 \cdot e^{-c} \quad \text{bzw.} \quad T = \frac{I_D}{I_0} \sim e^{-c}$$ (BEERsches Gesetz)

Dabei ist T die Transmission oder Lichtdurchlässigkeit (sie wird in Prozent ausgedrückt mit I_0 = 100%) und c die Konzentration des Stoffes in der Lösung (in mol/l). Zur Vereinfachung verwendet man als Messgröße die der Konzentration proportionale Extinktion E (engl. auch absorbance A oder optical density OD) und dekadische Logarithmen:

$$E = -\lg T = -\lg \frac{I_D}{I_0}$$

Außer von der Konzentration ist die Extinktion auch von der Schichtdicke d linear abhängig (LAMBERTsches Gesetz). Das zusammengefasste LAMBERT-BEERsche Gesetz lautet damit:

$$E \sim d \cdot c \quad \text{bzw.} \quad E = \varepsilon \cdot c \cdot d$$

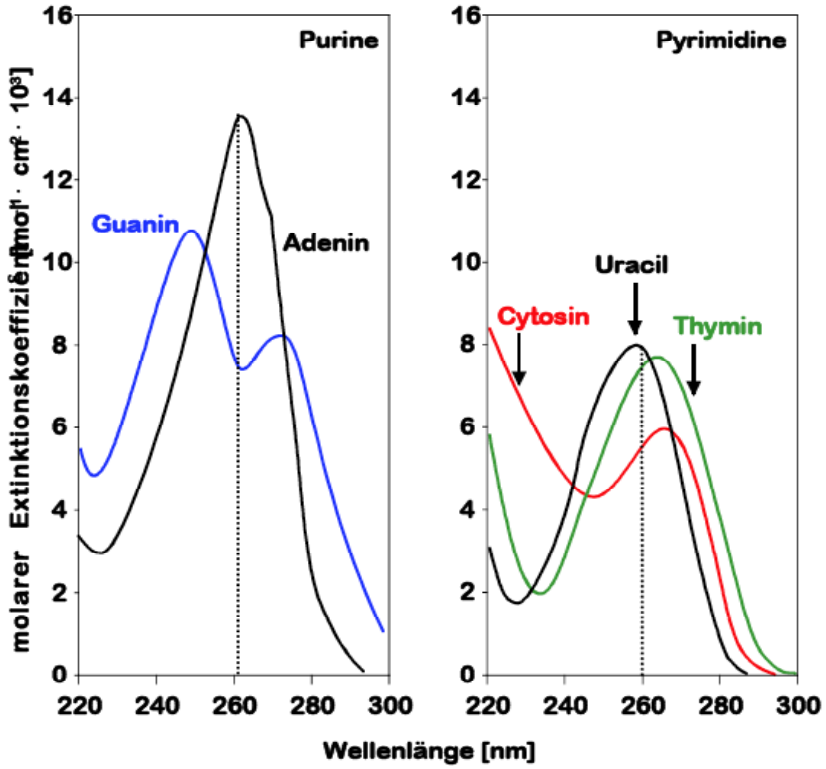
Dabei ist ε der molare dekadische Extinktionskoeffizient (= Extinktion einer molaren Lösung des Stoffes bei einer Schichtdicke 1 cm). Er ist abhängig von der chemischen Natur des Stoffes (Stoffkonstante), von der Wellenlänge der Strahlung, der Temperatur, dem pH und dem Lösungsmittelsystem. (Welche Dimension hat ε ?) Voraussetzung für die Anwendung eines photometrischen Verfahrens ist, dass der zu bestimmende Stoff entweder selbst absorbiert (was z.B. bei Proteinen oder Nukleinsäuren im UV-Licht der Fall ist) oder durch eine chemische Reaktion in ein absorbierendes, meist also farbiges Produkt überführt werden kann. Man nimmt dann ein Absorptionsspektrum dieses Produktes auf, d.h. man misst die Extinktion bei verschiedenen Wellenlängen. Dabei wird man ein oder mehrere Absorptionsmaxima finden. Man wählt eine Wellenlänge in der Nähe des Maximums – je nach vorhandenen Filtern und Lichtquellen – für das Bestimmungsverfahren aus. Anschließend muss noch durch Anlegen einer Eichkurve mit verschiedenen

Konzentrationen der reinen Substanz die Anwendbarkeit des LAMBERT-BEERschen Gesetzes nachgeprüft, bzw. ein passender Konzentrationsbereich ausgewählt werden.

Wichtig:
Abweichungen vom LAMBERT-BEERschen Gesetz können besonders bei höheren Konzentrationen auftreten; sie beruhen auf gegenseitige Beeinflussung der absorbierenden Moleküle und auf Veränderung ihrer Solvatation mit steigender Konzentration. Das LAMBERT-BEERsche Gesetz gilt nur bei Verwendung von monochromatischem Licht und in homogenen Lösungen.

Optische Eigenschaften von Nukleinsäuren

Für die Analytik der Nukleinsäuren, der Nukleotide und ihrer Derivate ist die Absorption von UV-Licht durch die Purin- und Pyrimidinbasen von größter Bedeutung. pH-Änderungen, Wasserstoff-Brückenbildung und das sogenannte „base-stacking“[2] haben erheblichen, die Anknüpfung von Ribose bzw. Desoxyribose und deren Phosphate an die Basen dagegen nur unwesentlichen Einfluss auf die Absorption. Das Nukleinsäurespektrum ist daher ein Mischspektrum aus den Spektren der 5 vorkommenden Basen (Figur 1).



Figur 1: UV-Absortionsspektren der Purin- und Pyrimidinbasen von Nukleinsäuren bei einem pH-Wert = 7.

[2] Zwischen den Ebenen benachbarter Basen treten Attraktionskräfte auf. Das resultierende Übereinanderschichten der Basen wird als „base-stacking“ (engl. to stack = stapeln) bezeichnet.

Elektrophorese

Die auf ein geladenes Molekül im elektrischen Feld ausgeübte Kraft K ist der elektrischen Ladung Q des geladenen Teilchens und der Feldstärke E direkt proportional:

$$K = Q \cdot E$$

Die Teilchen erfahren eine gleichförmig beschleunigte Bewegung. Der Kraft K wirkt die Reibung R entgegen, die der Geschwindigkeit v der Teilchen, ihrem Radius r und der Viskosität η des Lösungsmittels proportional ist:

$$R = 6\pi \cdot \eta \cdot v \cdot r$$

Kurz nach Anlegen des elektrischen Feldes geht die gleichmäßig beschleunigte in eine gleichmäßige Bewegung über (K = R). Es gilt dann:

$$v = \frac{Q \cdot E}{6\pi \cdot \eta \cdot r}$$

Daraus folgt:

1. Ein geladenes Teilchen wandert im elektrischen Feld umso schneller, je größer seine Ladung Q und je geringer sein Radius r ist.
2. Die elektrophoretische Beweglichkeit ist eine Stoffkonstante, die zur Charakterisierung von Proteinen dienen kann, sofern alle übrigen Parameter konstant gehalten werden.

Die Wanderungsgeschwindigkeit wird darüber hinaus von der Ionenstärke des Elektrophoresepuffers beeinflusst. Hohe Ionenstärke führt zu großer Wärmeentwicklung, kleinen Wanderungsstrecken, aber scharfen Banden. Niedrige Ionenstärke hingegen führt zu geringer Wärmeentwicklung, großen Wanderungsstrecken, allerdings zu unscharfen Banden. Die Wahl eines Puffersystems erfolgt weitesgehend empirisch.

Bei pH-Werten oberhalb des isoelektrischen Punktes bewegen sich Proteinmoleküle zur Anode, bei pH-Werten unterhalb des isoelektrischen Punktes zur Kathode.

Elektrophoresen werden üblicherweise auf Trägermaterialien, die mit einer Pufferlösung getränkt sind, durchgeführt. Als Träger dienen Filterpapier, Cellulose, Celluloseacetat, Stärkegel, Kieselgel, Agarosegel und Polyacrylamidgel. Die Enden des Trägers tauchen in je eine von zwei voneinander getrennten Abteilungen einer Elektrophoresekammer, die mit Elektrodenpuffer gefüllt sind.

Bei der elektrophoretischen Trennung sammeln sich die einzelnen Komponenten der aufgetragenen Probe in Banden oder Querzonen. Daher rührt auch die Bezeichnung Zonenelektrophorese. Nach Beendigung der Trennung werden die getrennten Fraktionen durch Anfärben sichtbar gemacht. Der Anfärbung folgt in vielen Fällen eine Entfärbung, um überflüssigen Farbstoff zu entfernen. Durch das Färben von Agarosegelen mit Ethidiumbromid gelingt es geringe Mengen wie 1-10 ng DNA oder RNA sichtbar zu machen. Das so erhaltene Elektropherogramm kann photometrisch ausgewertet werden.

Polymerase-Ketten-Reaktion

Die Methode der Polymerasekettenreaktion (“polymerase chain reaction” = PCR) hat die Molekularbiologie revolutioniert. Sie erlaubt die *in-vitro*-Vermehrung (“Amplifikation”) einer spezifischen DNA-Sequenz aus wenigen Ausgangs-DNA-Molekülen.

Die PCR ist eine DNA-Synthese im Reagenzglas, katalysiert durch eine DNA-abhängige DNA-Polymerase (genau wie *in-vivo* auch). Um aktiv sein zu können, benötigt das Enzym:

- Eine Einzelstrang-DNA als Matrize für die Synthese eines neuen, komplementären Stranges. In der PCR erhält man diese Einzelstränge durch thermische Trennung (Denaturation oder Schmelzen) doppelsträngiger DNA.
- Ein kurzes Stück doppelsträngiger DNA, um die Synthese zu beginnen (Primer). Man kann also den Startpunkt der DNA Synthese festlegen, indem man ein Oligonukleotidprimer hinfügt, der sich an der gewünschten Stelle an die Matrize anlagert. Das ist die erste wichtigste Eigenschaft der PCR: ***man kann die DNA Polymerase gezielt zur Synthese eines speziellen DNA Bereiches einsetzen.***

Beide komplementäre DNA Stränge können als Matrize für die Synthese dienen, wenn man für jeden Strang einen Primer zusetzt. Diese wählt man für die PCR so aus, dass sie an den Bereichen der DNA angrenzen, der vervielfältigt werden soll, und ihre 3`Enden zueinander orientiert sind. Die neu synthetisierten DNA Stränge, die jeweils an einem Primer beginnen, reichen daher über die Position des Primers

des gegenüberliegenden Stranges hinaus. Folglich entstehen auf jedem neuen DNA-Strang auch wieder neue Primer-Bindestellen. Nach dem erneuten Erhitzen des Reaktionsgemisches werden die ursprünglichen und auch die neu entstandenen Stränge getrennt und stehen für weitere Runden der Primer-Hybridisierung, DNA Synthese und Strangtrennung zur Verfügung.

Das Endergebnis einer PCR ist ein Reaktionsgemisch, das nach *n* Zyklen ein theoretisches Maximum von 2*n* doppelsträngigen DNA-Molekülen enthält, welche Kopien der ausgewählten DNA-Sequenz zwischen den Primern darstellt (Abb. 2). Das ist die zweitwichtigste Eigenschaft der PCR: ***sie ermöglicht die exponentielle Vervielfältigung des gewünschten DNA Bereiches.***

Ablauf einer PCR

Ausgangsmaterial einer PCR ist DNA, welche die gewünschte Sequenz enthält. Man braucht diese Sequenz nicht zu isolieren, denn sie wird durch die in der Reaktion verwendeten Primer definiert. Dazu werden die beiden Oligonukleotidprimer, welche die Startpunkte der DNA Synthese determinieren, die DNA-Polymerase und eine Mischung aller vier Desoxynucleotid-Triphosphate gegeben.

In dem nächsten Schritt wird das Reaktionsgemisch auf 94°C erhitzt. Bei dieser Temperatur trennen sich die DNA Stränge vollständig voneinander. Sie bilden Einzelstränge, die zu Matrizen für die Primer und die DNA-Polymerase werden. Danach senkt man die Temperatur. Dadurch wird die Bindung der Oligonukleotidprimer an ihre Zielsequenzen (“Annealing” oder Hybridisierung) ermöglicht: Der erste Primer bindet an die komplementären Sequenzen des einen DNA-Stranges, der andere Primer in gewisser Entfernung am Gegenstrang. Diese *annealing Temperatur* bestimmt entscheidend über die Spezifität einer PCR. Im nächsten Schritt erhöht man die Temperatur auf 72° C. Das ist die optimale Temperatur für die hitzestabile *Taq*-Polymerase. Die Temperatur wird bis zu fünf Minuten lang auf 72° C gehalten, damit die DNA-Synthese ablaufen kann.

Am Ende dieser Zeitspanne erhöht man die Temperatur wiederum auf 94° C: durch dieses erneute Erhitzen des Reaktionsansatzes trennen sich die kurzen doppelsträngigen DNA Stränge (der ursprüngliche und der neu synthetisierte

komplementäre Strang) voneinander. Diese Einzelstränge werden in einer weiteren Runde der DNA Synthese zu Matrize. Der ganze Zyklus- Erhitzen zur Trennung der Stränge, Binden der Primer (Primer-Hybridisierung) und Kettenverlängerung - wiederholt sich 25 - 40 mal. (Abb. 2). (Ein PCR-Ansatz enthält von vornherein sehr viele Primermoleküle, ca. 10^{12} Oligonukleotid**moleküle** von **einer** Sorte. So ist es nicht erforderlich, nach jedem Zyklus für das Annealing erneut Primer zuzusetzen).

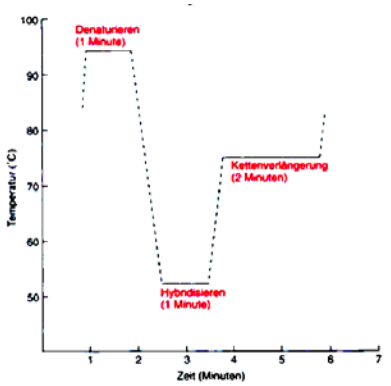


Abb. 2: Typischer Temperaturverlauf einer PCR

Ursprünglich benutzte man für die PCR die DNA-Polymerase aus *E.coli*, welche bei hohen Temperaturen zerstört wird. Ein wichtiger methodischer Fortschritt wurde durch den Einsatz von DNA-Polymerasen aus Bakterien, die in heißen Quellen leben, erreicht. Heute wird in der Regel die Polymerase von *Thermus aquaticus* ("Taq-Polymerase") verwendet, die ein Temperaturoptimum von 72°C besitzt und selbst bei 94°C noch recht stabil ist. Weil dieses Enzym den DNA-Denaturierungsschritt übersteht, muss man - im Gegensatz zu früher - heute nicht mehr für jede Kettenverlängerungsphase erneut Enzym zugeben.

Diese Entwicklung hat die Automatisierung der PCR mit Hilfe von Temperaturwechselgeräten (*thermal cycler)* ermöglicht. Diese sind Heizblöcke, die man so programmieren kann, dass die Zeit- und Temperaturzyklen für eine PCR automatisch ablaufen können.

Abb. 3: Ein Temperaturwechselgerät, wie es im Praktikum verwandt wird

Die hohe Temperaturresistenz der *Taq*-Polymerase bringt einen weiteren Vorteil mit sich. Die Bindung des Primers an die Zielsequenz - das Annealing - sowie die anschließende Synthese können bei hohen Temperaturen durchgeführt werden, was die Spezifität des Prozesses erheblich verbessert. Primer binden nämlich nicht nur an exakt passende, sondern auch an lediglich ähnliche Zielsequenzen mit einigen Fehlpaarungen. Solche falsch gepaarten Primer-Matrizenkomplexe sind allerdings thermolabiler, so dass bei höheren Temperaturen die Wahrscheinlichkeit, dass der Primer an eine zufälligerweise ähnliche (aber falsche) Zielsequenz bindet, erheblich sinkt.

Die Berechnung des Schmelzpunktes von Primern und die Kriterien der Primerauswahl wurden bereits am ersten Praktikumstag besprochen.

Produktion von rekombinanten Proteinen in Bakterien

Um Proteine in Bakterien exprimieren zu können, benötigt man komplementäre DNAs (*complementary* DNA; cDNA). Die cDNA leitet sich von der mRNA ab, d.h. sie ist zu der mRNA komplementär und wird durch die *in vitro* reverse Transkription (reverse Transkriptase) von mRNA Molekülen gewonnen. Die so gewonnene cDNA kann nun in einen Vektor (z.B ein Plasmid) eingefügt werden (diesen Prozess nennt man Klonierung). Die Wahl des Vektors hängt von dem gewünschten Organismus ab, in dem die Produktion des rekombinanten Proteins erfolgen soll (siehe Tab. 1).

Es gibt zahlreiche medizinische und technische Anwendungsbereiche für hochgereinigte Proteine wie z.B.: Insulin, Interferone, koloniestimulierende Faktoren, rekombinante Antikörper, Impfstoffe, Enzyme in Waschmitteln. Die Herstellung solcher Proteine durch Reinigung aus Organismen, die sie natürlicherweise exprimieren, kann höchst aufwendig

oder ganz unmöglich sein. In solchen Fällen kann man sich die heterologe Expression in Bakterienzellen zu Nutze machen.

Die folgende Tabelle gibt eine Übersicht über die Vor- und Nachteile der verschiedenen erhältlichen Expressionssysteme. Die angegebenen Werte sind nur Orientierungshilfen und können im Einzelfall um mehrere Größenordnungen über- bzw. unterschritten werden.

Tab. 1: Vergleich verschiedener Expressionssysteme

	Bakterien	**Hefe**	**Insektenzelle**	**Pflanzen**	**Säugetierzell**
Ausbeute	10-1000 mg/lit	10-100 mg/lite	10-100 mg/lite	10-100 mg/kg	0,1-1 mg/liter
Disulfidbrücke	nein	ja (Sekretion)	ja (Sekretion)	ja	ja (Sekretion)
Aufwand	niedrig	mittel	mittel	niedrig	hoch
Preis	niedrig	niedrig	mittel	niedrig	hoch
Industriemaßs	ja	ja	ja	ja (theoretisch	nein (aufwend
Probleme	Faltung	Sekretion	Handhabung	Gesetzgebung	Handhabung
Faltung	nein	ja	ja	ja	ja
Transfekt. Effizienz	10^6 Kol/µg DNA	5-10 Kol/µg DNA	Sehr hoch (Virales Syste	Abhängig Pflanzenart	1-100 Kol/µg DNA

Die Expressionskassette: der kodierende Bereich der zu exprimierenden cDNA wird - meist unter Verwendung von PCR-Technologie - hinter einen entsprechenden Promotor kloniert. Hierbei ist darauf zu achten, dass für die verschiedenen Expressionssysteme verschiedene Promotor erforderlich sind.

Bakterielle Expressionsvektoren enthalten in aller Regel einen induzierbaren Promotor (lac, tac, T7) sowie eine 'Multiple Cloning Site'. Signale der Translation (ATG, TAG, TAA, TGA) befinden sich entweder auf der zu exprimierenden cDNA oder sind im Vektor enthalten und müssen beim Einklonieren beachtet werden (Leseraster).

Zur Expression von rekombinanten IL-6 wurde die kodierende IL-6-Sequenz in einen pRSET-Vektor kloniert und unter Kontrolle des T7-Phagen-Promoters gestellt (Abb.3).

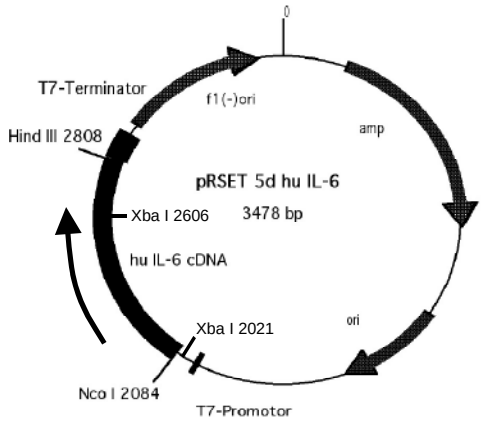


Abb. 3: Das bakterielle Expressionsplasmid PRSET 5d hu IL-6

Das Gen für die RNA-Polymerase des Phagen T7 wiederum ist im Genom des E.coli-Stammes BL-21 integriert worden und wird von dem Promotor des Galaktosidasegens (lacZ) kontrolliert. Wird den transformierten Bl-21-Zellen ein Galaktoseanalogon zugesetzt, das den Repressor bindet, aber nicht durch Galaktosidase hydrolysiert werden kann, kommt es zur kontinuierlichen Expression des dahintergeschalteten Gens, in diesem Fall der Phagen-T7-RNA-Polymerase. Diese besitzt eine hohe Transkriptionseffizienz und transkribiert nun die rekombinante IL-6-cDNA in hoher Menge (Abb.4).

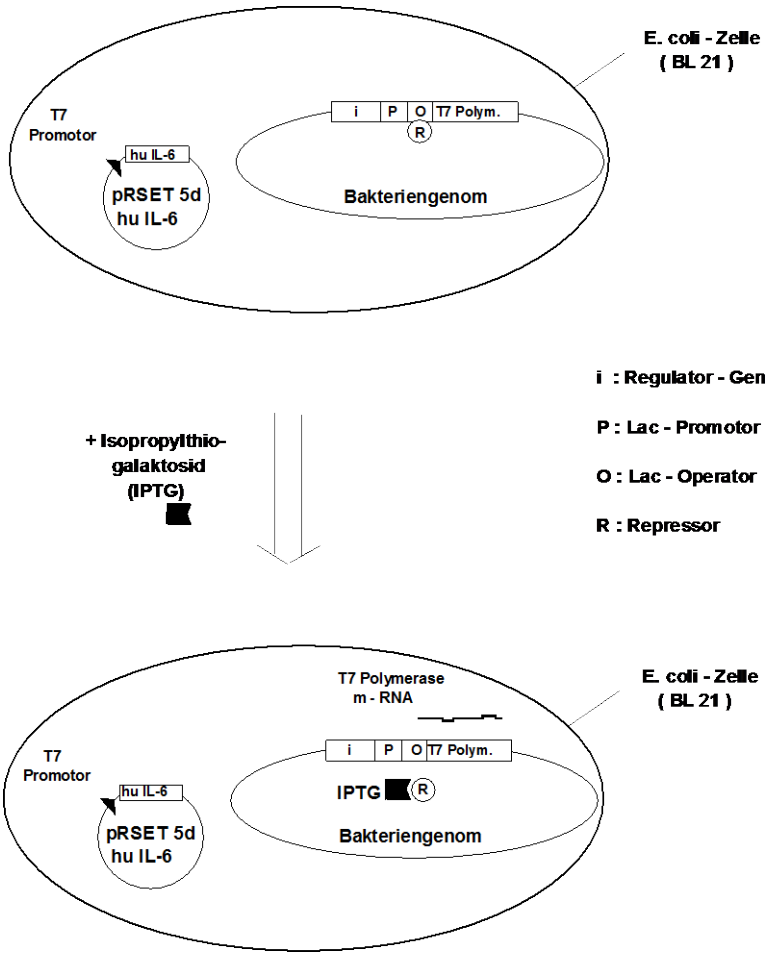


Abb. 4: Transkriptionsschema der IL-6 cDNA im pRSET 5d-Vektor nach Transformation in E.coli BL-21

Für die Transformation des rekombinanten pET-Plasmids (pRSET 5d IL-6) wurde der *E.coli*-Stamm BL-21 verwendet, in dessen Genom das Gen für die RNA-Polymerase des Phagen T7 integriert wurde. Das T7-RNA-polymerasegen ist an den Promoter des Galaktosidasegens (lacZ) fusioniert und wird von diesem kontrolliert. Nach Induktion der Expression von Phagen-T7-RNA-Polymerase durch das Zuckeranalogon Isopropyl-ß-Thiogalaktosid (IPTG) wird die hinter einen T7-Promoter geschaltete IL-6-cDNA im Plasmid pRSET 5d-IL-6 mit hoher Effizienz transkribiert.

Aufgabe 1: UV-Spektrum von Nukleotiden

In diesem Versuch sollen UV-Spektren von Nukleotid-Lösungen aufgenommen werden.

Achtung!

Für die Photometrie im UV-Bereich (unter 350 nm) müssen spezielle und teure Plastikküvetten verwendet werden. Seien Sie daher in der Handhabung sorgsam und rühren Sie nicht mit Glas- oder Metallgeräten in der Küvette!

Durchführung:

1. Sie erhalten die Küvetten mit den unten angegebenen Lösungen, **wobei Küvette 1 mit dem SSC-Puffer als Referenz dient und während der gesamten Messungen im Küvettenhalter des JASCO V-530 Photometers (hintere Postition) bleibt.** Küvette Nr. 2-5 werden nacheinander in den vorderen Küvettenhalter gestellt und ein entsprechendes Spektrum wird aufgenommen.

   - Küvette 1: 1 ml Standard Saline-Citratpuffer (SSC); **verbleibt im Photometer**
   - Küvette 2-5: 1 ml Nacheinander Nukleotid-Lösungen (**A**; **B**; **C**; **D**) in SSC

2. Das Spektrum soll von 320 - 220 nm aufgenommen werden. Die Bedienung des Photometers wird Ihnen von den Assistenten erklärt!

Auswertung:

Siehe Anhang!

Aufgabe 2: Wärmedenaturierung von nativer DNA.

In diesem Versuch soll das Verhalten einer DNA-Lösung bei Hitzedenaturierung demonstriert werden.

Benötigte Lösungen:

SSC (standard saline citrate)	150 mM NaCl + 15 mM Natriumcitrat ad 1000 ml mit Aqua bidest., eingestellt auf pH 7,5
DNA-Lösung	angesetzt in SSC

Durchführung:

1. Drei 2 ml Reaktionsgefäße (Eppi) werden beschriftet und wie folgt beschickt:

Eppi	**Probe**
1	1 ml DNA-Lösung
2	1 ml DNA-Lösung
3	1 ml DNA-Lösung

Wichtig: Schließen Sie die Reaktionsgefäße sorgsam und achten Sie darauf, dass der am Deckel befindliche Haken unter den Rand des Reaktonsgefäßes greift.

2. Die Reaktionsgefäße 2 und 3 werden für 15 Minuten in ein 100°C Wasserbad gestellt. Danach wird Reaktionsgefäß 2 sofort anschließend im Eisbad abgekühlt und Reaktionsgefäß 3 langsam auf dem Labortisch im Reagenzglasständer ca. 15 min stehengelassen bis die Lösung Raumtemperatur erreicht hat. Reaktionsgefäß 2 verbleibt solange im Eisbad, bis von allen drei Ansätzen nacheinander UV-Spektren aufgenommen werden können. (Siehe Aufgabe Nr. 1).

Auswertung: Siehe Anhang!

Aufgabe 3: Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Wir werden eine PCR-Reaktion mit einem Plasmid durchführen, das die humane Interleukin-6-Sequenz enthält (siehe Abb. 3.). Als Kontrolle werden wir dieselbe PCR-Reaktion mit einem Kontrollplasmid durchführen, das keine Interleukin-6-Sequenz enthält. Die verwendeten Primer sollten ein DNA-Fragment amplifizieren, 525 Basenpaare lang ist (siehe Abb 3.). Die PCR-Reaktionen werden über eine Gelelektrophorese in einem Agarose-Gel analysiert.

Das PCR-Protokoll

Folgende Komponenten sind typischerweise Bestandteile eines PCR-Reaktionsansatzes:

1,5 mM $MgCl_2$
10 mM Tris-HCl, pH 8,3
50 mM KCl
je 200 µM dATP, dGTP, dCTP, dTTP, enthalten im dNTP-Mix*
1 U *Taq* DNA Polymerase Taq-Pol-Verdünnung
50 ng 1. Primer
50 ng 2. Primer
1 ng Plasmid-DNA

Jede Gruppe bereitet 2 verschiedene Reaktionsansätze vor, einen zum Nachweis von IL-6 cDNA und einen mit einem negativen Kontrollplasmid (pRSET 5d ohne IL-6 cDNA).
Beide Ansätze unterscheiden sich nur im zugegebenen Plasmid (s.u.).

Durchführung:

Es werden zwei Ansätze folgendermaßen pipettiert:

1. 10 µl PCR-Puffer;
2. 10 µl dNTP-Mix;
3. 10 µl Primer -Mix
5. In den einen Ansatz werden dann 10µl pRSET 5d hu IL-6 und in den anderen 10 µl pRSET 5d Plasmid-Lösung gegeben.
6. 10 µl Taq-Polymerase Verdünnung (0,25U/µl);
7. Nun erfolgt die Durchführung der PCR Reaktion im Thermocycler nach folgendem Temperaturprogramm (Assistent).

94°C	5min	
94°C	30 sec.	
60°C	30 sec.	
72°C	30 sec	x20
72°C	5 min	
10°C	∞	

7. Nach Ablauf der Reaktion erfolgt die Analyse der PCR-Produkte durch eine Agarosegel-Elektrophorese.
8. In beide Reaktionsgefäße werden jeweils 10 µl Auftragspuffer (Xylencyanol 0,25 %; Bromphenolblau 0,25 %, Ficoll 400 20% in Aqua bidest.) pipettiert, durch auf- und abpipettieren gemischt, kurz zentrifugiert (30 sec; 14.000 rpm; rounds per minute), damit sich die gesamte Lösung am Boden des Reaktionsgefäßes befindet. Die Probe ist nun fertig und kann auf das Agarosegel aufgetragen werden **(zusammen mit den Proben aus Versuch Nr. 4)**.

Elektrophorese

Sowohl Proteine als auch Nukleinsäuren können durch Wanderung im elektrischen Feld (Elektrophorese) charakterisiert werden. Gemische verschiedener Proteine bzw. Nukleinsäuren unterschiedlicher Länge und/oder Struktur können elektrophoretisch voneinander getrennt werden.

Die Agarosegelelektrophorese ist eine der wichtigsten Methoden zur Größenbestimmung von DNA-Fragmenten. Bei dieser Technik werden die DNA-Fragmente auf ein horizontales Agarosegel aufgetragen. Wenn elektrischer Strom durch das Gel fließt, wandern die negativ geladenen Fragmente mit einer Geschwindigkeit, die abhängig von der Länge der Fragmente ist, in Richtung Pluspol. Je kürzer ein Fragment ist, umso schneller wandert es. Die Mobilität eines DNA-Fragmentes ist im Agarosegel proportional zum Logarithmus seiner Molmasse. Diese Gesetzmäßigkeit gilt aber nur für bestimmte Molmassenbereiche und für lineare Moleküle. Plasmide in der „supercoiled“ Form zeigen z.B. ein verändertes Laufverhalten. Die Fragmente können im Agarosegel durch Ethidiumbromid, einen Fluoreszenzfarbstoff, der mit DNA Komplexe bildet, unter UV-Licht sichtbar gemacht werden.

ACHTUNG:

Vorsicht! 1 %ige Ethidiumbromid ist giftig. Hautkontakt mit dem Agarosegel oder dem Elektrophoresepuffer vermeiden!

Vorbereitung:

Ein fertiges 1 %iges Agarosegel wird bereitgestellt. Um es zu gießen, wurde 1,5 g Agarose in 135 ml Aqua bidest. gegeben und zum Kochen gebracht. Nach Abkühlen auf 55°C wurden 15 ml 10-fach TAE-Puffer (400 mM Tris-Acetat, 20 mM EDTA) und 15 µl 1%ige Ethidiumbromidlösung hinzugefügt und das Gel auf dem mit Tesafilm abgedichteten horizontalen Schlitten mit eingehängtem Kamm für die Auftragstaschen gegossen. Nach Erkalten ist das Gel einsatzbereit. Das Gel wurde in die mit 1-fachem TAE (10-fach TAE 1: 10 verdünnt) gefüllte Elektro-phoresekammer gestellt und der Kamm vorsichtig entfernt.

Durchführung:

1. Die Probe kann auf das Gel aufgetragen werden. Hierzu wird die Probe mit einer 50 µl Eppendorfpipette mit gelber Spitze aufgezogen.
2. Die Spitze wird dann so in die mit Puffer gefüllte Geltasche gebracht, dass das Ende ungefähr auf halber Höhe der Tasche ist. Dann wird die Spitze langsam bis zum ersten Druckpunkt der Eppendorfpipette entleert. Nicht bis zum zweiten Druckpunkt entleeren, damit keine Luft in die Tasche gebracht wird! Durch das Ficoll ist die Probe schwerer als der Elektrophoresepuffer und sinkt auf den Boden der Tasche.
3. Wenn alle Gruppen ihre Probe aufgetragen haben, wird die Spannungsquelle vom Praktikumassistent angeschlossen. Hierbei muss auf die richtige Polung geachtet werden (wie sind DNA-Fragmente geladen?).
4. Das Gel wird mit 140V ca. 3/4 Stunde laufen gelassen.
5. Nach Ende der Elektrophorese wird vom Gel unter UV-Licht bei einer Wellenlänge von 254 nm ein Polaroidfoto durch den Praktikumsassistent angefertigt und Ihnen als Fotokopie ausgehändigt. Außerdem haben Sie die Möglichkeit sich das Agarose-Gel auf einem UV-Licht emittierenden „Tisch“ anzuschauen.

Auswertung:

Siehe Anhang, dazu benötigen Sie dieses Bild des DNA Größenstandards!

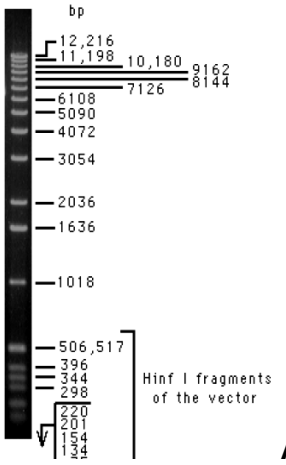


Abb.4: DNA Größenstandard für die Agarosegel-Elektrophorese

Aufgabe 4: Restriktionsverdau von Plasmid-DNA und Größenbestimmung von DNA Fragmenten durch Agarosegelelektrophorese

Restriktionsenzyme und Verdau

Restriktionsenzyme oder Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, die DNA-Moleküle zerschneiden können. Der Schnitt findet dabei nicht an einer beliebigen Stelle statt, sondern an einer spezifischen Nukleotidsequenz, die von dem Restriktionsenzym erkannt wird. Die Erkennungssequenzen sind normalerweise Palindrome, d.h. symmetrisch und damit in beiden Strängen gleich (siehe unten). Jedes Restriktionsenzym hat seine eigene, spezifische Erkennungssequenz. Ihren Namen haben sie erhalten, weil "Restriktion" in diesem Fall die Beschränkung der Schneideeigenschaften auf die spezifische DNA-Sequenz beschreibt. Restriktionsenzyme gehören zu den wichtigsten molekularen Werkzeugen beim Klonieren von DNA und haben daher in der Molekularbiologie eine enorme Bedeutung erlangt. Mit Hilfe von Restriktionsenzymen können rekombinante DNA-Moleküle hergestellt werden, indem zum Beispiel mit ihrer Hilfe der ringförmigen DNA-Strang eines Plasmids an einer bestimmten Stelle geschnitten wird. Oft trennen die Restriktionsenzyme die beiden Stränge der Vektor-DNA um einige Nukleotide versetzt, so dass so genannte "klebrige Enden" (engl. *sticky ends*) entstehen. Aber es gibt auch Enzyme, die die DNA glatt aufschneiden, ohne dass solche klebrige Enden entstehen (engl. *blunt ends*). DNA-Fragmente mit komplementären (d.h. zueinander passenden) "klebrigen Enden" (engl. *sticky ends*) lassen sich miteinander verknüpfen. Zerlegt man beispielsweise eine Spender-DNA mit dem gleichen Restriktionsenzym, mit dem man einen Plasmidring aufgeschnitten hat, lassen sich die entstandenen DNA-Fragmente in das Plasmid "einkleben", weil die "klebrigen Enden" zueinander passen.

Beispiel:
Das Restriktionsenzym EcoRI erkennt die Sequenz GAATTC

5’.....XXXXXXXGAATTCXXXXXX.....’3
3’.....XXXXXXXCTTAAGXXXXXX.....’5

wird gespalten in

5’.....XXXXXXXG AATTCXXXXXX....’3.

3’.....XXXXXXXCTTAA GXXXXXX.....’5

wobei gilt:

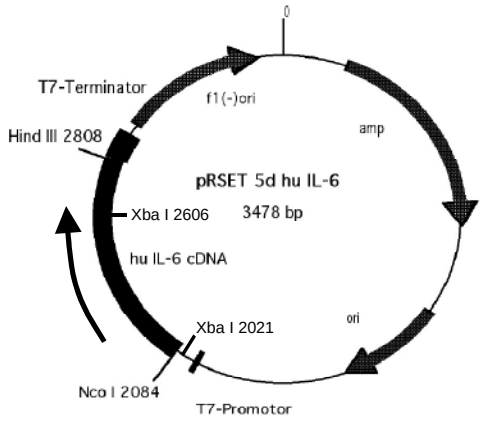
X, beliebige Base

G, Guanosin

A, Adenin

T, Thymidin

C, Cytosin



Plasmidkarte des von uns verwendeten Plasmids. Es handelt sich um das Plasmid pRSET 5d hu IL-6, das eine human Interleukin-6 (IL-6) cDNA (1100 bp) trägt.

Durchführung

Benötigte Lösungen:

DNA (Plasmid-Lösung)	0.1 µg/µl wässrige Plasmidlösung
1*Restriktionsenzym-Puffer	33 mM Tris-Acetat (pH 7.9 at 37°C), 10 mM Magnesium Acetat, 66 mM Kalium Acetat, 0.1mg/ml BSA
Restriktionsenzym: Xba I (10U/µl)	**Lagerpuffer:** 10 mM Tris-HCl (pH 7.5 bei 25°C), 100 mM KCl, 10mM DTT, 0.1 mM EDTA, 0.2 mg/ml BSA und 50% Glycerin

1. Pro 5er-Gruppe: In zwei 1,5 ml Reaktionsgefäße werden jeweils 10 µl einer 0,1 µg/µl Plasmidlösung A und B pipettiert (Hubkolbenpipette) und mit A und B beschriftet.
2. Dazu kommen jeweils 10µl 5*Restriktionsenzym-Puffer (Hubkolbenpipette).
3. In die Reaktionsgefäße werden 20µl H_2O pipettiert.
4. In beide Reaktionsgefäße werden 10µl XbaI pipettiert.
5. Beide Reaktionsgefäße werden 10 Sekunden bei 14.000 rpm in einer Tischzentrifuge zentrifugiert und danach für 0.5 h im Wasserbad bei 37°C inkubiert.
6. In jedes Reaktionsgefäß werden jeweils 10 µl Auftragspuffer (Xylencyanol 0,25 %; Bromphenolblau 0,25 %, Ficoll 400 20% in Aqua bidest.) pipettiert, durch auf- und abpipettieren gemischt und kurz zentrifugiert (30 sec; 14.000 rpm; rounds per minute), damit sich die gesamte Lösung am Boden des Reaktionsgefäßes befindet. Die Proben sind nun fertig und können auf das Agarosegel aufgetragen werden **(Zusammen mit den Proben aus Versuch Nr. 3).**

Auswertung:

Siehe Anhang!

Aufgabe 5: Transformation von Bakterien mit einem Interleukin-6 Expressionsplasmid

Bakterienzellen können fremde DNA-Moleküle aus dem Medium aufnehmen und diese können sich in der Bakterienzelle replizieren. Die Bakterien wurden vor einer Transformation durch eine Behandlung mit eiskaltem $CaCl_2$ aufnahmefähiger gemacht, man spricht dann von kompetenten Zellen.

E. coli Bakterien werden im Rahmen des Praktikums mit dem pRSET 5d huIL-6 und H_2O (als Kontrolle) transformiert: Zu jeweils 50 µl der auf Eis aufgetauten kompetenten Bakterien, werden jeweils 10 µl Plasmid-DNA (pRSET 5d hu IL-6 Plasmid aus Aufgabe Nr. 3) bzw. 10 µl H_2O zu pipettiert und die Mischung dann 15 min auf Eis inkubiert. Es folgt ein Hitzeschock bei 42 °C im Wasserbad für genau 90 Sekunden, während dieser Zeit nehmen die Bakterien die Plasmid-DNA auf. Ob ein Plasmid aufgenommen wurde kann man anhand der Expression der auf diesem Plasmid kodierten Antibiotika-Resistenz-Gene erkennen. Werden solche Resistenz-Gene exprimiert, so verleihen sie den Wirtzellen eine entsprechende Resistenz.

Die Bakterien werden anschließend abgekühlt (2 min auf Eis) und je Ansatz mit 100 µl LB-Medium versetzt. Es folgt eine Inkubationsphase für 30 min im 37 °C-Brutschrank, während dieser Zeit kann die Plasmidreplikation und die Resistenz-Gen-Expression anlaufen. Danach werden die Bakteriensuspensionen resuspendiert und auf die bereitgestellten Agarplatten, welche Ampicillin enthalten, ausgestrichen. Die Inkubation der Platten erfolgte über Nacht bei 37 °C.

LB-Medium

10 g/ L	Trypton/ Pepton
5 g/ L	Hefeextrakt
10 g/ L	Natriumchlorid

LB-Agar

10 g/ L	Trypton/ Pepton
5 g/ L	Hefeextrakt

10 g/ L	Natriumchlorid
1,2 %	Agar-Agar

Dem LB-Agar wurde vor dem Gießen der Platten Ampicillin in einer Endkonzentration von 50 µg/mL beigefügt.

Praktische Aufgaben 1 bis 5

Praktikumsgruppe:

Namen der Praktikanten:

Aufgabe 1:

(Kleben Sie hier die UV-Spektren ein!)

Beschreiben und diskutieren Sie die UV Spektren? Von welchen Nukleotiden könnten Sie die Spektren aufgenommen haben? Was ist DNA, RNA? Was sind Nukleasen? Informieren Sie sich über die Strukturen der einzelnen Basen (Adenin, Guanin, Thymin, Cytosin)? Wo kommt Uracil vor? Was gibt der molare Extinktionskoeffizient an? Welche Einheit hat er?

.....

.....

.....

.....

.....

Aufgabe 2:

(Kleben Sie hier die UV-Spektren ein!)

Vergleichen Sie das UV Spektrum der Lösung 1 mit den UV-Spektren aus Aufgabe 1. Diskutieren Sie die (unterschiedliche?) Extinktion der drei DNA-Lösungen unter Berücksichtigung des hyperchromen Effektes und der Reversibilität. Was ist der hyperchrome Effekt und wovon hängt es ab? Wie würde sich RNA verhalten? Wie stabil ist DNA bzw. RNA in 1M Natronlauge? Skizzieren Sie was mit RNA in 1M NaOH passiert!

.....

.....

.....

.....

.....

Aufgabe 3 und 4:

Bestimmen Sie anhand des Polaroidfotos und den bekannten Längen der Standards (Abb. 4) die Längen der mittels PCR amplifizierten und der verdauten Fragmente !

Wie kann man die Längen unbekannter Fragmente bestimmen, die nicht den Fragmenten des Standards zuzuordnen sind ?

(Kleben Sie hier das Foto bzw. den Ausdruck ein)

Diskutieren Sie die Ergebnisse zur **Aufgabe 3**!
Warum ist nur in dem Ansatz mit den Primern ein PCR Fragment zu erkennen? Wo spielt die PCR heutzutage eine wichtige Rolle?

.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....

Diskutieren Sie die Ergebnisse zur **Aufgabe 4!**
Erklären Sie das Fragmentmuster und berechnen Sie die Größe der Fragmente! Wie liegt die ringförmige Plasmid-DNA in Lösung vor? Denken Sie sich mindestens fünf Erkennungssequnzen von Restriktionsenzymen aus und schreiben Sie sie auf! Wie lautet der biochemische Fachbegriff für das „Einkleben“ von DNA Fragmenten?

.....
.....
.....
.....
.....
.....

Aufgabe 5:

Wie funktioniert die Transformation von Bakterien? Was bedeutet „kompetent“ in diesem Zusammenhang? Diskutieren Sie, warum es sinnvoll ist Plasmide in Bakterien einzubringen?

Was ist cDNA, wodurch unterscheidet sie sich von genomische DNA?

BIOCHEMISCHES PRAKTIKUM III

Proteine: Aufbau, Eigenschaften und Funktionen

Aufgabe 1: **Produktion rekombinanter Proteine in Bakterien**

Aufgabe 2: **pK-Wert-Bestimmung eines Puffersystems**

Aufgabe 3: **pH-Optimum einer Phosphatase**

Aufgabe 4: **Elektrophoretische Auftrennung von menschlichem Serum**

Aufgabe 5: **K_M und v_{max} einer sauren Phosphatase für p-Nitrophenylphosphat, Kompetitive Hemmung**

Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
Biochemisches Institut
In der Medizinischen Fakultät
Olshausenstrasse 40, 24098 Kiel

Stichworte – Vorausgesetztes Wissen

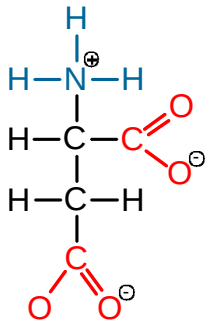
- pH-Wert
- pK-Wert
- Puffer, Berechnung des pH-Wertes von Puffern
- Einfluss des pH-Wertes auf die Struktur und den Säurecharakter von Aminosäuren und Proteinen
- Isoelektrischer Punkt von Aminosäuren und Proteinen
- Ladungsverteilung, hydrophile und hydrophobe Bereiche in globulären Proteinen, Dipolmoment
- Löslichkeit von globulären Proteinen
- Denaturierung von Proteinen
- Abhängigkeit der Enzymaktivität von Zeit, pH-Wert, Temperatur
- Substratspezifität von Enzymen
- Hydrolasen: Phosphatasen, Nukleasen
- Kinetisches Modell enzymatischer Reaktionen nach Michaelis und Menten
- Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Substratkonzentration in verschiedenen Darstellungen
- K_M, v_{max}
- Kompetitive, nicht-kompetitive Enzymhemmung
- Reversible und irreversible Enzymhemmung
- Rekombinante Proteine aus Bakterien
- Glaselektrode

Einleitung

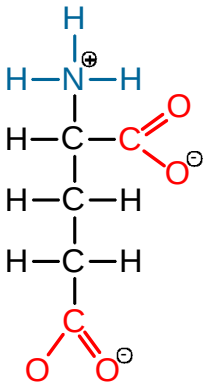
Proteine als Polyelektrolyte, Isoelektrischer Punkt

22 verschiedene Aminosäuren dienen als Bausteine der Proteine. Alle Aminosäuren tragen am α-C-Atom eine Carboxylgruppe, die in neutraler Lösung als Säure wirkt, d.h. ein Proton an das Wasser abgibt, und eine basische Aminogruppe, die unter gleichen Bedingungen ein Proton aus dem Wasser aufnimmt. Im fertigen Protein sind diese Gruppen zu Peptidbindungen verknüpft, die weder als Säuren noch als Basen wirken. Da jedoch einige Aminosäuren zusätzlich saure oder basische Gruppen in den Seitenketten tragen, enthalten auch die Proteine viele solche Gruppen. Ein Protein aus 500 Aminosäuren enthält in neutraler Lösung etwa 100 geladene Gruppen, hauptsächlich Carboxylgruppen in den Seitenketten von Glutaminsäure und Asparaginsäure, sowie die Aminogruppe in der Seitenkette des Lysins und die Guanidinogruppe in der des Arginins.

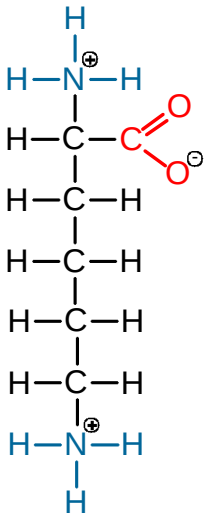
Asparaginsäure
pK-Wert 4,0



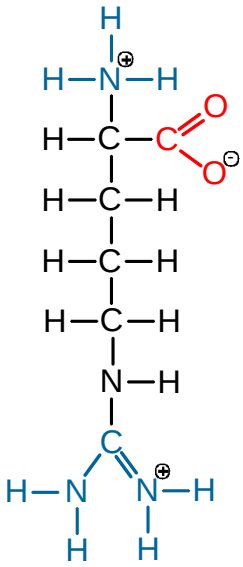
Glutaminsäure
pK-Wert 4,3



Lysin
pK-Wert 10,8



Arginin
pK-Wert 12,5



Durch die Anordnung dieser Ladungen auf der Oberfläche werden viele Eigenschaften des Proteins festgelegt, wie z.B. auch die katalytische Wirkung im aktiven Oberflächenbereich der Enzyme, dem „aktiven Zentrum“. Entsprechend dem pK-Wert der jeweiligen Gruppe ändert sich die Ladung mit dem pH-Wert der Lösung. In saurer Lösung überwiegen die positiven Ladungen, in alkalischer Lösung die

negativen. Der pH-Wert, bei dem ein Protein gleichviel positive und negative Ladungen trägt, wird als **Isoelektrischer Punkt** (IEP) bezeichnet. Er ist eine Naturkonstante für das entsprechende Protein.

Löslichkeit, Fällung, Denaturierung von Proteinen

Die Löslichkeit der Proteine kann durch mehrere Parameter beeinflusst werden.

a) Durch die Anwesenheit von Fremd- (nicht Peptid-) Anteilen im Protein.

Hier wirken sich insbesondere Lipidanteile von Lipoproteinen vermindernd, Kohlenhydratanteile (in Glycoproteinen, siehe Praktikum III) hingegen verbessernd auf die Löslichkeit aus.

b) Durch die Anzahl und Verteilung der Ladungen auf der Proteinoberfläche.

Durch unregelmäßige Verteilung von Ladungen und anderen polaren Gruppen auf der Proteinoberfläche existiert ein räumlicher Abstand zwischen den Schwerpunkten positiver und negativer Ladung im Protein, der dieses zum elektrischen Dipol macht. Die z.T. erheblichen Dipolmomente (das Produkt aus Ladungsgröße und Abstand der Ladungsschwerpunkte) führen stets zur gegenseitigen Attraktion gelöster Proteinmoleküle und müssen beim Lösen eines Proteins überwunden werden. Der Dipolattraktion entgegen wirken elektrostatische Abstoßungskräfte, die durch Überwiegen positiver oder negativer Ladungen an allen Proteinmolekülen hervorgerufen werden und eine größere Reichweite besitzen als die Dipolkräfte.

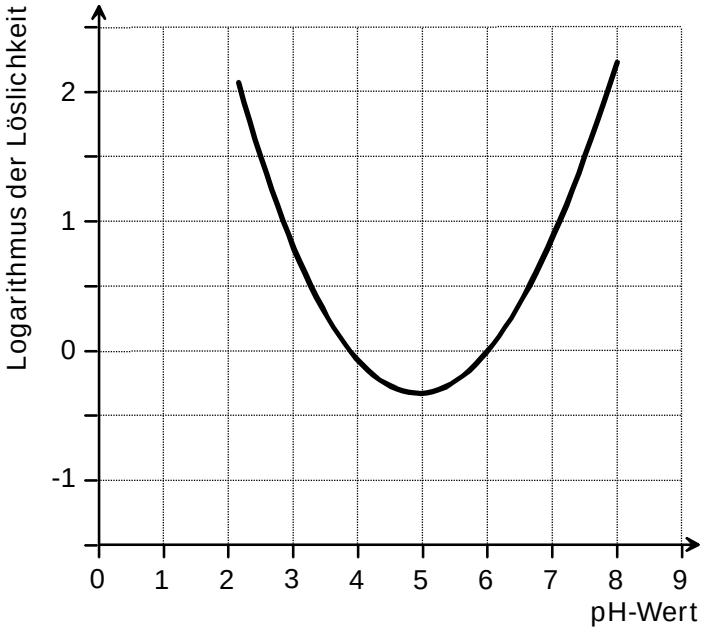


Abbildung 1: Löslichkeitskurve eines Proteins in Abhängigkeit vom pH-Wert (im abgebildeten Beispiel ist der Isoelektrische Punkt bei pH 5).

Die Zu- oder Abnahme der ionisierten Amino- und Carboxylgruppen durch Änderung des pH-Wertes verändert die Löslichkeit der Proteine. Ein Beispiel zeigt Abbildung 1. Am Isoelektrischen Punkt (IEP) tragen Proteinmoleküle in der Regel ein Maximum an Ladungen. Entsprechend entwickeln sie ein maximales Dipolmoment, das die Aggregation der Moleküle untereinander fördert. Außerdem ist am IEP die Zahl positiver und negativer Ladungen gleich, so dass die Abstoßungskräfte, die durch das Überwiegen gleicher Ladungen wirksam werden, fortfallen. Die Löslichkeit erreicht daher am IEP ein Minimum. Viele Proteine fallen aus.

Die Ausfällbarkeit verschiedener Proteine bei verschiedenen pH-Werten kann zur Auftrennung von Proteingemischen benutzt werden.

Bei extremen pH-Werten sind alle Ladungen eines Proteins gleichsinnig. Das Molekül vergrößert sein Volumen durch intramolekulare elektrostatische Abstoßung.

c) Durch die räumliche Verteilung von hydrophoben und hydrophilen Aminosäuren im Proteinmolekül.

   Die Behandlung von nativen Proteinen mit Säure, Alkali, organischen Lösungsmitteln, konzentrierten Harnstoff- oder Guanidinlösungen, sowie Behandlung mit Hitze oder UV-Strahlen führen zur Denaturierung der Proteine. Als Denaturierung bezeichnet man die Auffaltung der charakteristisch gefalteten Struktur der Polypeptidkette eines globulären Proteinmoleküls zu einer ungeordneten Struktur. Dabei treten die bislang ins Molekülinnere hineinragenden, überwiegend hydrophoben Seitenketten an die Oberfläche. Die Löslichkeit sinkt daher. Allgemein ändern sich bei der Denaturierung die chemischen und physikalischen Eigenschaften.

d) Durch die Veränderung der Zusammensetzung des Lösungsmittels, z. B. durch Beimengung von organischen Flüssigkeiten oder von Ionen.

   Die Ausfällung von Proteinen nahe dem IEP kann unterstützt werden durch Zusatz von organischen Lösungsmitteln zum Wasser.

   Derartige Stoffe (am häufigsten werden Alkohole und Aceton, gelegentlich Chloroform verwendet) erniedrigen die Dielektrizitätskonstante des Wassers, vergrößern damit die Dipolattraktion zwischen den Proteinmolekülen und stören zudem als ebenfalls polare Stoffe die Ausbildung der Hydrathüllen. Da dieses

Verfahren die Gefahr einer Denaturierung des Proteins birgt, nimmt man die Fällung meist bei Temperaturen weit unter 0°C vor.

Die meisten Proteine lösen sich in reinem Wasser schlecht, da die Dipolkräfte eine ausreichende Solvatisierung der Moleküle nicht erlauben. Zusatz geringer Salzmengen zum Wasser führt zur teilweisen „Abschirmung“ der Protein-Oberflächenladung durch eine gegensinnig geladene Ionenschicht, die ihrerseits eine Hydrathülle trägt. Abbildung 2 zeigt einen solchen „Einsalzeffekt“ am Beispiel des Hanfsamenglobulins Edestin. Albumin und manche Glycoproteine sind dagegen auch in reinem Wasser löslich.

Oberhalb eines Optimums nimmt mit steigender Ionenstärke im Lösungsmittel die Löslichkeit der Proteine wieder ab, bis es zur Ausfällung kommt (**Aussalzeffekt**). Der Wassermantel der Proteine verringert sich mit steigender Salzkonzentration, da die Ionen des Salzes mit den polaren Aminosäureresten um die Wassermoleküle konkurrieren. Da verschiedene Proteine – je nach ihrer Löslichkeit – bei verschiedenen Ionenstärken ausfallen, wird das Aussalzen häufig zu einer ersten, groben Fraktionierung von Proteingemischen verwendet. Meistens wird Ammoniumsulfat benutzt. Die durch Einstellen des IEP oder durch Aussalzen erzielten Proteinfällungen sind voll reversibel, wenn man die fällende Maßnahme rückgängig macht, Fällungen durch organische Lösungsmittel dagegen nur, soweit keine Denaturierung eingetreten ist.

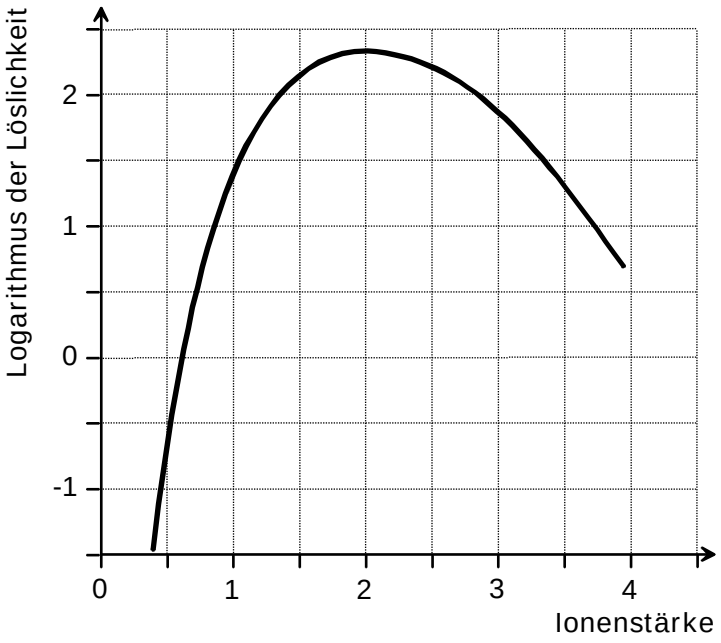


Abbildung 2: Löslichkeit des Hanfsamen-Globulins Edestin in Abhängigkeit von der Konzentration an Na_2SO_4.

Der Einfluss von pH und Temperatur auf die Enzymaktivität

Die Geschwindigkeit von Enzymreaktionen steigt, wie die anderer chemischer Umsetzungen, mit Erhöhung der **Temperatur**. Bei 10° Temperaturerhöhung wird die Geschwindigkeit etwa verdoppelt bis verdreifacht. Mit steigender Temperatur setzt aufgrund des Proteincharakters der Enzyme aber auch ein gegenläufiger Prozess ein: durch Hitze-Denaturierung (Aufbrechen der Proteintertiärstruktur) werden die Enzyme irreversibel inaktiviert. So ergibt sich für Enzymreaktionen ein Temperaturoptimum.

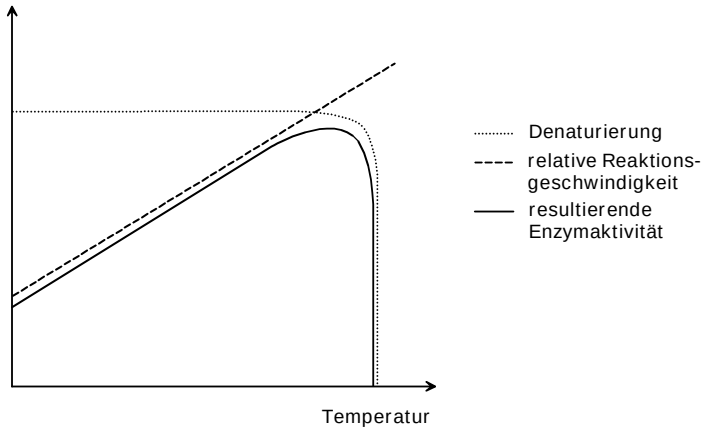


Abbildung 3: Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Temperatur

Die meisten Enzyme besitzen ein pH-Optimum, bei dem ihre Aktivität ein Maximum durchläuft. Die Kurvenform kommt durch Überlagerung mehrerer Effekte zustande. Verschiedene Parameter können hier bestimmend sein, nämlich:

a) die pK-Werte von ionisierbaren Gruppen im aktiven Zentrum des Enzyms. Solche Gruppen können entweder für die Bindung des Substrats oder direkt für den Katalyse-Vorgang notwendig sein.

b) pK-Werte anderer Gruppen im Enzym, die zur Stabilisierung der aktiven Konformation notwendig sind.

c) pK-Werte funktioneller Gruppen im Substrat.

Beispiel: Enzymatische Spaltung von Nukleinsäuren:

Es gibt zahlreiche „Nukleasen“ (Nukleinsäuren-spaltende Hydrolasen), die nach verschiedenen Gesichtspunkten eingeteilt werden:

a) DNAsen spalten nur DNA. RNAsen spalten nur RNA.

b) Endonukleasen spalten innerhalb einer Polynukleotidkette, Exonukleasen vom 5´- bzw. vom 3´-Ende einer Polynukleotidkette.

c) Nukleasen der Spezifität I spalten a-Typ-Bindungen und setzen 5'-Phosphorsäuremonoester frei. Nukleasen der Spezifität II spalten b-Typ-Bindungen und setzen 3'-Phosphorsäuremonoester frei.

Wichtige Nukleasen:

DNase I (Pankreas) und DNase II (Milz) sind Endonukleasen und erzeugen Oligodesoxyribonukleotide.

Restriktionsendonukleasen spalten DNA nur bei bestimmten Basen-Sequenzen, meist "Palindrome", d.h. mit spiegelsymmetrischer Basenanordnung.

RNase A (Pankreas) spaltet nur b-Typ-Bindungen "hinter" (d.h. bei üblicher Schreibweise von 5´ nach 3´ rechts von) Pyrimidinbasen, RNase T_1 (aus Pilzen) oder U_1 (aus Bakterien) nur b-Typ-Bindungen „hinter“ Guanin, RNase T_2 „hinter“ Adenin. Diese Enzyme sind daher Endonukleasen der Spezifität II.

Die oben genannten RNasen greifen nur RNA-Bezirke ohne Sekundärstruktur an.

Phosphodiesterase I (aus Schlangengift) ist eine Exonuklease, die vom 3´-Ende einer RNA oder DNA 5´-Mononukleotide freisetzt. Phosphodiesterase II (aus Milz) arbeitet in entgegengesetzter Richtung.

Biokatalyse:Proteine als Katalysatoren

Proteine, die spezifisch eine chemische Reaktion beschleunigen, ohne selbst dabei verändert zu werden, bezeichnet man als **Enzyme** (in einzelnen Fällen wird Biokatalyse auch durch RNA ausgeübt, man spricht dann von Ribozymen). Die Aufgabe 6 soll einige grundlegende Eigenschaften von Enzymen verdeutlichen.

Messung der Enzymaktivität

Um die katalytische Wirksamkeit (=Aktivität) eines Enzyms zu messen, bestimmt man entweder die Abnahme der Substratkonzentration, oder besser die Bildung eines Reaktionsproduktes in Abhängigkeit von der Zeit. Die Bedingungen, unter denen die zu messende Reaktion abläuft, müssen genau definiert sein: z.B. der pH-Wert, die Temperatur, die Substratkonzentration zu Reaktionsbeginn usw.

Wir definieren als Maß für die Enzymaktivität die Einheit U:

$$1\,\mathrm{U} = \frac{1\,\mu\mathrm{mol\ umgesetztes\ Substrat}}{1\,\mathrm{Minute}}$$

Diese Einheit ist international gebräuchlich. Das SI-Einheitensystem bildet die Aktivitätseinheit Katal (kat) aus den Grundeinheiten mol und s:

$$1\,\mathrm{kat} = \frac{1\,\mathrm{mol\ umgesetztes\ Substrat}}{1\,\mathrm{Sekunde}}$$

Diese neuere Einheit hat sich jedoch bisher nicht durchgesetzt.

Enzymaktivitäten geben die durch Enzymzugabe bewirkte Reaktionsbeschleunigung an, gegebenenfalls ist die Geschwindigkeit der chemischen Reaktion ohne Enzym – meist sehr gering oder gar nicht messbar – als Leerwert abzuziehen.

Aktivitätsangaben werden meistens auf gewisse Probenvolumina, z.B. 1 ml, bezogen. Bei der Untersuchung von Körperflüssigkeiten (Serum, Harn) wählt man als Bezugseinheit für die Enzymeinheiten 1 Liter, bei der Analyse von zellulärem Material häufig g Frischgewicht, g Trockengewicht oder mg Protein. Unter festgelegten Bedingungen ist die Enzymaktivität ein Maß für die Enzymmenge. Bei der praktischen Bestimmung werden Konzentrationsänderungen pro Zeiteinheit verfolgt. In vielen Fällen sind photometrische Verfahren dafür besonders geeignet. Bei der photometrischen Messung wird aus der Extinktionsänderung pro Zeiteinheit ($\Delta E/\Delta t$) nach dem Lambert-Beerschen-Gesetz

$$E = \varepsilon \cdot c \cdot d$$

unmittelbar die Konzentrationsänderung pro Zeiteinheit ($\Delta c/\Delta t$) erhalten:

$$\frac{\Delta E}{\Delta t} = \varepsilon \cdot d \cdot \frac{\Delta c}{\Delta t} \quad \text{bzw.} \quad \frac{\Delta c}{\Delta t} = \frac{\Delta E}{\Delta t \cdot \varepsilon \cdot d}$$

Berücksichtigt werden muss noch die Verdünnung des Volumens der Enzymlösung v_p im Gesamtvolumen des Bestimmungsansatzes v_g, der Verdünnungsfaktor ist

somit v_g/v_p. Bezogen auf 1 ml Enzymlösung ergibt sich die Gleichung zur Berechnung von Enzymaktivitäten bei photometrischen Bestimmungsverfahren:

$$\text{Aktivität pro ml} = \frac{\Delta E \cdot v_g \cdot 1000}{\Delta t \cdot \varepsilon \cdot d \cdot v_p} \quad \text{in} \quad \frac{U}{ml}$$

- ΔE: gemessene, lineare Extinktionsänderung
- Δt: Messzeitraum [Minuten]
- ε: molarer Extinktionskoeffizient [$cm^2 \cdot mol^{-1} \cdot 1000$] der zu messenden Substanz (Extinktion einer 1 M Lösung dieser Substanz in Küvetten mit 1 cm Weglänge)
- d: Schichtdicke der Küvette, meist 1 cm
- v_g: Gesamtvolumen des enzymatischen Ansatzes bei der Messung von E [in ml]
- v_p: Volumen der in den Ansatz gegebenen Enzymprobe [in ml]

Ein Faktor 1000 ergibt sich, da ε in Liter, dagegen die Aktivität in ml angegeben ist. Dividiert man die Enzymeinheiten/ml [U/ml] durch die Proteinkonzentration [mg/ml], so erhält man die **spezifische Aktivität:**

$$\text{spezifische Aktivität} = \frac{U}{\text{mg Protein}}$$

Die Proteinkonzentration ist durch ein gesondertes Bestimmungsverfahren (z.B. Biuret) zu ermitteln. Zellhomogenate ergeben niedrige spezifische Aktivitäten, in reiner Form isolierte Enzyme die maximal möglichen. Somit dient die spezifische Aktivität bei der Anreicherung und Reindarstellung von Enzymen als Kontrollgröße.

Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Substratkonzentration

I: Kinetisches Modell nach Michaelis und Menten

Ein einfaches Reaktionsschema, das auf enzymatische Reaktionen anwendbar ist, wurde von **Michaelis und Menten** vorgeschlagen:

(1) $$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \xrightarrow{k_2} E + P$$

Das Substrat (S) bindet in einem ersten Schritt an das aktive Zentrum des Enzyms (E) und bildet den Enzymsubstratkomplex (ES). In einem zweiten Reaktionsschritt wird das im Enzymsubstratkomplex gebundene Substrat zum Produkt (P) umgesetzt. Das Produkt verlässt das aktive Zentrum und gibt das Enzym wieder frei. Es kann so erneut mit einem Substrat reagieren.

Für den Enzymsubstratkomplex (ES) gilt:

(2) Bildungsgeschwindigkeit: $v_1 = [E] \cdot [S] \cdot k_1$

(3) Spaltungsgeschwindigkeit: $v_{-1} + v_2 = k_{-1} \cdot [ES] + k_2 \cdot [ES]$

Im stationären Fließgleichgewicht wird ES mit gleicher Geschwindigkeit gebildet und gespalten, d.h. ES häuft sich nicht an. Daher ist

(4) $$v_1 = v_{-1} + v_2$$

sodass aus den beiden vorausgegangenen Gleichungen folgt:

(5) $$(k_{-1} + k_2) \cdot [ES] = [E] \cdot [S] \cdot k_1$$

Da wir die Einwaagekonzentrationen $[E_0]$ und $[S_0]$ und nicht die augenblicklichen Konzentrationen [E] und [S] kennen, müssen wir folgende Substitutionen vornehmen:

(6) $$[E_0] = [E] + [ES]$$

(7) $$[S_0] = [S] + [ES]$$

Die Gültigkeit der Gl. (6) und (7) beruht auf dem Massenerhaltungsprinzip. Gleichung (7) können wir noch vereinfachen, da normalerweise die Substratkonzentration viel größer als die Enzymkonzentration ist, sodass [ES] klein gegenüber [S] wird:

(8) $[S_0] \cong [S]$, wenn $[E_0] \ll [S_0]$

Durch Substitution von Gleichung (6) und (8) in (5) erhält man:

(9) $(k_{-1} + k_2) \cdot [ES] = ([E_0] - [ES]) \cdot [S_0] \cdot k_1$

Nach [ES] aufgelöst folgt:

(10) $$[ES] = \frac{[E_0] \cdot [S_0] \cdot k_1}{k_{-1} + k_2 + k_1 \cdot [S_0]} = \frac{[E_0]}{\frac{k_{-1} + k_2}{k_1 \cdot [S_0]} + 1}$$

oder unter Zusammenfassung der Geschwindigkeitskonstanten zur **Michaeliskonstante K_M**:

(11) $$K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$$

folgt (12) $$[ES] = \frac{[E_0]}{\frac{K_M}{[S_0]} + 1}$$

K_M ist keine Gleichgewichtskonstante, aber sie nähert sich der Gleichgewichtskonstanten des ersten Schrittes (der Substratbindung)

(13) $$K = \frac{[E] \cdot [S]}{[ES]} = \frac{k_{-1}}{k_1}$$

wenn k_2 wesentlich kleiner ist als k_{-l}.

Die Umsatzgeschwindigkeit v ist gleich der Geschwindigkeit v_2 mit der das Produkt gebildet wird:

(14) $v_2 = k_2 \cdot [ES]$

oder nach Substitution von [ES] aus Gleichung (12):

(15) $$v_2 = \frac{k_2 \cdot [E_0]}{\frac{K_M}{[S_0]} + 1}$$

[ES] kann maximal gleich der Einwaagekonzentration $[E_0]$ werden, wenn das gesamte Enzym als ES vorliegt. Daher ist $k_2 \bullet [E_0]$ die maximal mögliche Geschwindigkeit der Produktbildung:

(16) $k_2 \cdot [E_0] = v_{max}$

Es folgt aus (15) und (16) die „Michaelis-Menten-Gleichung“

(17) $$v = \frac{V_{max}}{\frac{K_M}{[S_0]} + 1}$$

Die Substratabhängigkeit der Umsatzgeschwindigkeit eines Enzyms kann somit durch die Angabe von v_{max} und K_M beschrieben werden.

Die Michaelis-Menten-Gleichung sagt eine hyperbolische Abhängigkeit zwischen der Umsatzgeschwindigkeit v und der Substratkonzentration [S] voraus (siehe Abbildung 4). Dies konnte auch in den meisten Fällen bestätigt werden. Ausnahmen bilden z.B. allosterische Enzyme, die in späteren Praktikumversuchen bearbeitet werden (Praktikum VI).

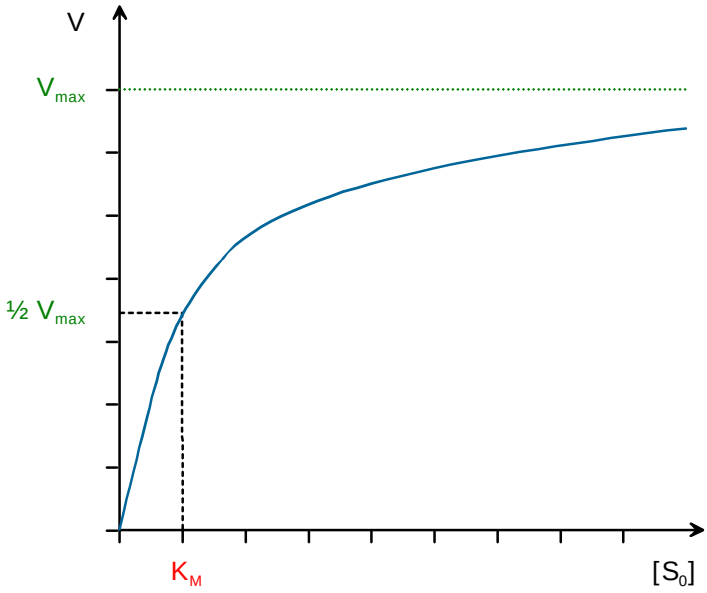


Abbildung 4: Darstellung der Enzymaktivität nach Michaelis und Menten

Für $[S_0] = K_M$ folgt aus (17):

(18) $$v = \frac{V_{max}}{2}$$

und aus (14) und (16)

(19) $$v_2 = \frac{k_2 \cdot [E_0]}{2} = k_2 \cdot [ES] \quad ; \quad [ES] = \frac{[E_0]}{2}$$

Bei der Substratkonzentration K_M läuft die Reaktion mit halbmaximaler Geschwindigkeit, und das Enzym ist zur Hälfte mit Substrat gesättigt.

K_M bestimmt sich aus dem zur halbmaximalen Geschwindigkeit gehörenden Abszissenwert.

Wenn Gleichung (17) umgeformt wird, erhält man Diagramme, aus denen K_M mit größerer Genauigkeit abgelesen werden kann:

(20) $$v \cdot \frac{K_M}{[S_0]} + v = V_{max} \Rightarrow \quad v = -K_M \frac{v}{[S_0]} + V_{max}$$

Wenn v gegen v/[S_0] aufgetragen wird, erhält man eine Darstellung nach Eadie-Hofstee (Abbildung 5). Lineweaver und Burk verwendeten die reziproke Form von Gleichung (17):

(21) $$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S_0]} + \frac{1}{V_{max}}$$

und bildeten 1/v gegen 1/[S_0] ab (siehe Abbildung 6).

Die Eadie-Hofstee-Abbildung hat den Vorteil, dass die Messgröße (v) linear aufgetragen wird. Dies vereinfacht statistische Korrekturen.

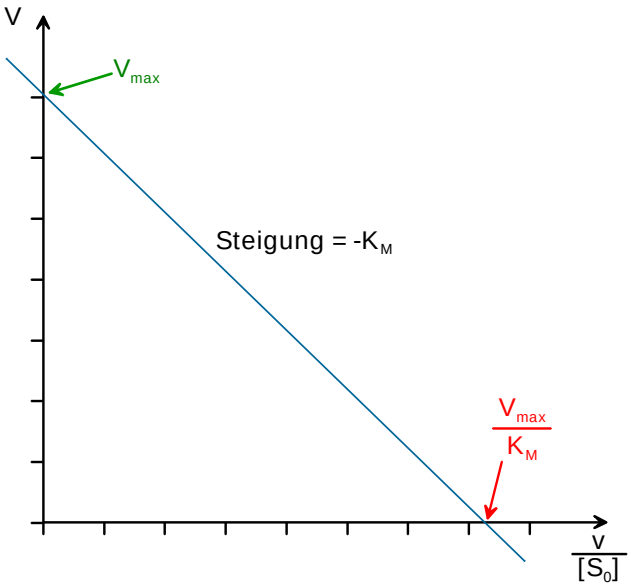


Abbildung 5: Darstellung nach Eadie und Hofstee.

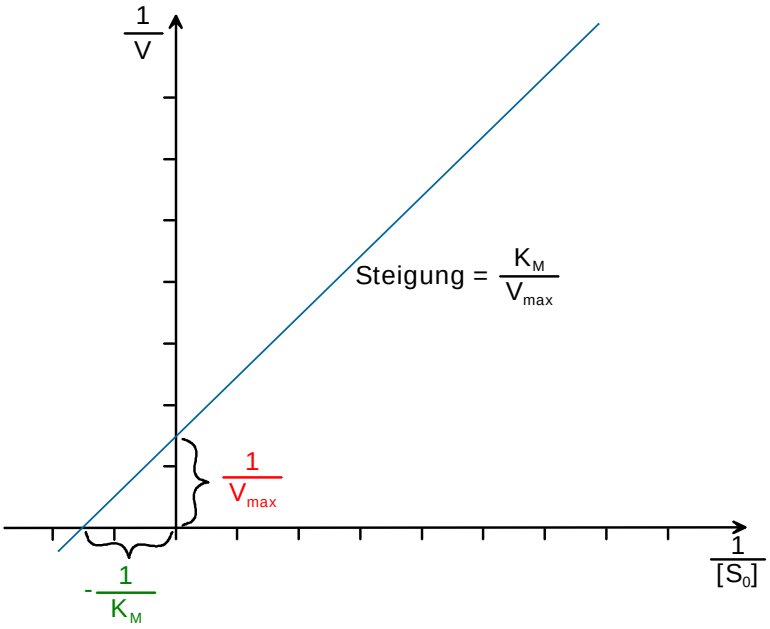


Abbildung 6: Darstellung nach Lineweaver und Burk.

II. Hemmung der Enzymaktivität

Als Hemmstoffe (Inhibitoren) werden Substanzen bezeichnet, welche die katalytische Umsatzrate eines Enzyms herabsetzen. Inhibitoren regulieren Enzymaktivitäten in der lebenden Zelle (zusammen mit Aktivatoren, siehe Praktikum VII „Leber“). Als Pharmaka oder Gifte sind sie aber auch für die Medizin wichtig, und als Hilfsmittel der biochemischen Forschung dienen sie der Aufklärung von Reaktionswegen des Stoffwechsels und in neuerer Zeit von Mechanismen der enzymatischen Katalyse. Inhibitoren ändern die Substratabhängigkeit der Umsatzrate in spezifischer Weise, sodass sich verschiedene kinetische Hemmungstypen abgrenzen. Einige sind in den Abbildungen 8 und 10 in doppelt reziproker Auftragung (Lineweaver-Burk) dargestellt. Eine eindeutige Zuordnung von kinetischem Hemmungstyp und enzymatischem Mechanismus ist nicht möglich, da mehrere Reaktionsmechanismen das gleiche kinetische Verhalten zeigen.

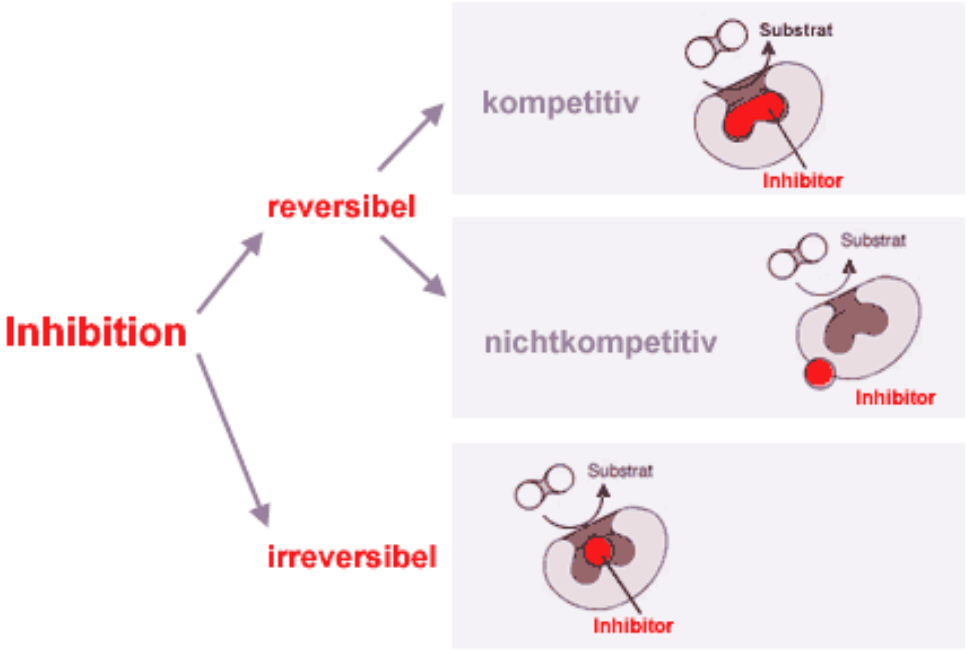


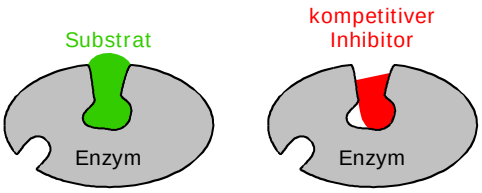
Abbildung 7: Hemmung der Enzymaktivität.

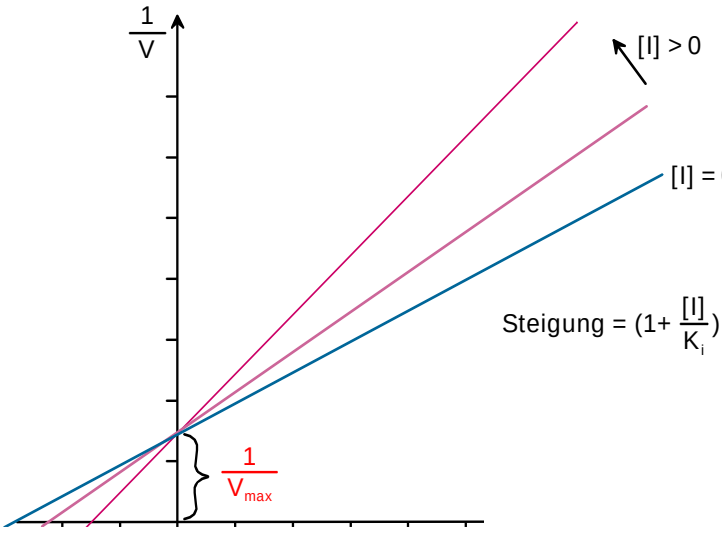
a) Kompetitive Hemmung

Der Inhibitor wird in einer Gleichgewichtsreaktion reversibel an das aktive Zentrum des Enzyms gebunden. Es besteht Konkurrenz (engl. competition) zwischen Inhibitor und Substrat um den Substratbindungsort im katalytischen Zentrum des Enzyms. Analog der Substrat-Bindungskonstante K wird als Inhibitorkonstante K_i definiert:

(22) $$K_i = \frac{[I]\cdot[E]}{[EI]}$$

Abbildung 8: Kompetitive Inhibition. Der Inhibitor bindet an das aktive Zentrum des Enzyms.





Bei einer gegebenen Inhibitorkonzentration [I] und kleinem [S] liegt das Enzym überwiegend als [EI] vor. K_M ist erhöht, d.h. die Substrataffinität des Enzyms (gemittelt über alle Enzymmoleküle) ist vermindert. Bei gleichem [I] und großem [S] liegt das Gleichgewicht auf der Seite von [ES]. Daher wird v_{max} bei großem [S] erreicht.

$$E \underset{}{\overset{+S}{\rightleftharpoons}} ES \longrightarrow E + P$$
$$\Big\Updownarrow +I$$
$$EI$$

In der Darstellung nach Lineweaver-Burk (Abbildung 8) schneiden sich die mit verschiedenem [I] aufgenommenen Geraden auf der Ordinate. Kann der Inhibitor I durch das Enzym nicht umgesetzt werden, spricht man von „dead end inhibition“. In

anderen Fällen wird I umgesetzt, wobei ein Produkt P´ entsteht; wird dieses durch die Messmethode für P nicht mit erfasst, resultiert eine kompetitive Hemmung (siehe Aufgabe 5). Kompetitive Inhibitoren ähneln in ihren für die Bindung an das Enzym wesentlichen Strukturmerkmalen stets dem Substrat, mit dem sie kompetieren. Sie sind „sterische Substratanaloge“.

Beispiele kompetitiver Inhibition:

L-Benzylsuccinat, Hemmung des Verdauungsenzyms Carboxypeptidase

Bernsteinsäuredehydro-genase, ein Enzym der Mitochondrien hat als Substrat **Bernsteinsäure** und wird durch **Malonsäure** gehemmt

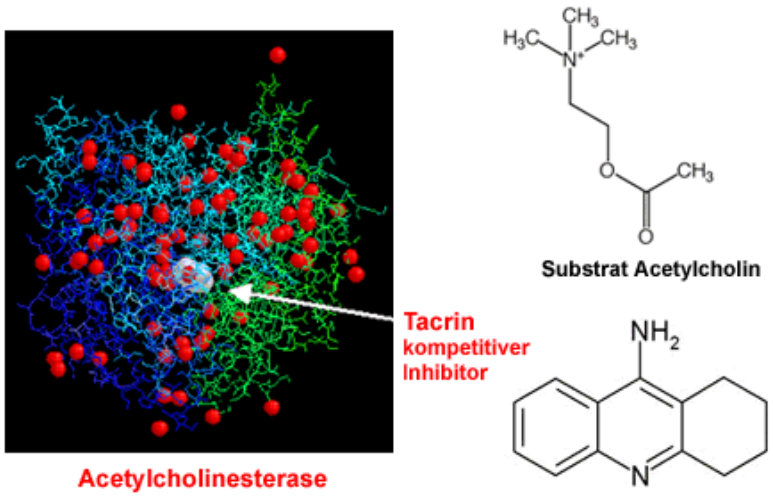


Abbildung 9: Inhibition der Acetylcholesterinesterase

Acetylcholinesterase, ein Enzym in Nervenzellen hat als Substrat **Acetylcholin** und wird durch **Tacrin** kompetitiv gehemmt. Das Medikament wird bei der Alzheimer-krankheit verabreicht. Auch das Produkt der Reaktion wirkt kinetisch in der Regel als kompetitiver Inhibitor, da es den Substratbindungsort des Enzyms besetzt. Bei großem [P] findet daher (neben verstärkt ablaufender Rückreaktion) eine kompetitive **Produkthemmung** statt.

b) Allosterische Hemmung (nicht-kompetitive Hemmung)

Der Inhibitor kompetiert nicht mit dem Substrat um die Bindungsstelle im aktiven Zentrum, sondern wird reversibel an einer anderen Stelle des Enzyms gebunden. Es kann sich ein ternärer Komplex EIS bilden. Von allosterischer Hemmung spricht man, wenn gemäß dem nebenstehenden Schema die Bildung von P aus EIS nicht möglich ist oder langsamer abläuft als aus ES. Dadurch kann v_{max} auch bei großem [S] **nicht** erreicht werden. In der Auftragung nach Lineweaver-Burk liegt der Schnittpunkt der Geraden für ungehemmte und gehemmte Reaktion nicht auf der Ordinate, sondern

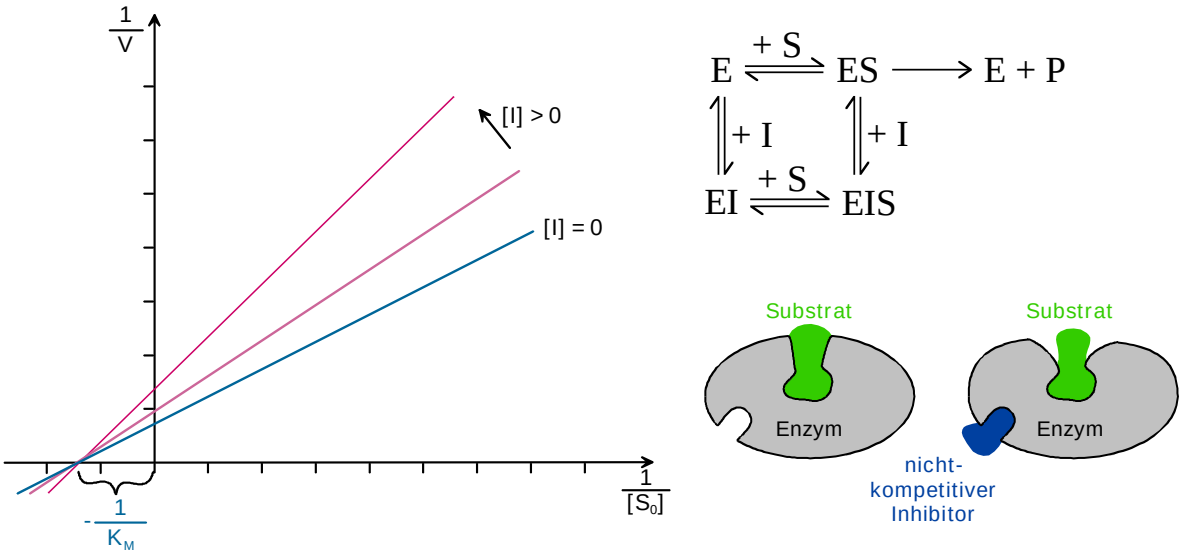
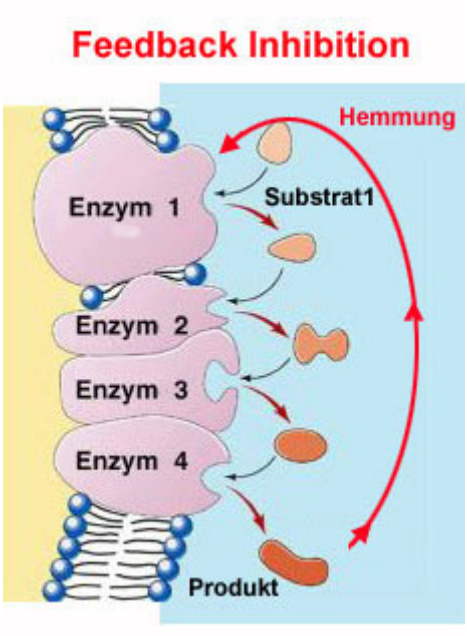


Abbildung 10: Allosterische Inhibition. Der Inhibitor bindet an einer eigenen Bindungsstelle ausserhalb des aktiven Zentrums.

auf der Abszisse (Abbildung 10), deshalb bleibt K_M unverändert, d.h. die Substratbindung im EIS-Komplex ist ebenso stark wie im ES-Komplex. Diese „reine“ allosterische Hemmung ist selten verwirklicht. Meistens ist auch die Substratbindung durch die Gegenwart des Inhibitors mehr oder weniger stark beeinträchtigt. Viele Fälle allosterischer Hemmung (siehe Praktikum VII „Leber“) gehören diesem kinetischen Hemmungstypus an. Bei der allosterischen Hemmung haben im allgemeinen Hemmstoff und Substrat keine gemeinsamen Strukturmerkmale.



Beispiele allosterischer Inhibition:

Hemmung des Verdauungsenzym Trypsin durch Kallikrein A.

Hemmung von Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase durch D-Threose-2,4-di-phosphat. Endprodukthemmung: Dabei wird ein Enzym in der Zellatmung, die Citratsynthetase allosterisch durch das Endprodukt ATP gehemmt.

Endprodukthemmung der Threonindesaminase im Aminosäurestoffwechsel, indem das Enzym allosterisch durch das Endprodukt Isoleucin gehemmt wird.

Abbildung 11: Endprodukthemmung/ Feedback-Hemmung der Citratsynthetase durch ATP.

c) Irreversible Hemmung (= Modifizierung des Enzyms)

Bestimmte Hemmstoffe werden kovalent und irreversibel an Enzyme gebunden. In diesem Falle versagt die quantitative Michaelis-Menten-Kinetik, da sie reversible Bindung aller Reaktionsteilnehmer voraussetzt.

Beispiele irreversibler Inhibition:

Diisopropylfluorophosphat (DIFP) hemmt irreversibel Serin Proteasen und andere Enzyme.

Sogenannte Alkylphosphate (z. B. auch als Kampfgase wie Sarin und in Insektiziden vorhanden) binden sich kovalent an die Acetylcholinesterase. Dieses Enzym sorgt für die Weiterleitung von Nervenimpulsen. Die Organismen sterben an Lähmung der Organfunktion.

Die Enzyme, die direkt an der ATP-Gewinnung in den Mitochondrien beteiligt sind (**Cytochrome**) lassen sich durch Cyanid-Ionen (**CN^-**; Zyankali) irreversibel hemmen. Viele Enzyme werden durch **Schwermetalle** wie **Hg^{2+}, Cd^{2+}, As^{2+} und Pb^{2+}** gehemmt, z. B. **GAPD**. Dabei binden sich die Metallionen an eine **-SH-oder -OH-Gruppe an der aktiven Stelle**.

$$\text{Protein-SH} + Pb^{2+} + \text{HS-Protein} \text{ -----> } \text{Protein-S-Pb-S-Protein} + 2H+$$

Weitere, physiologisch besonders wichtige Enzymhemmungsmechanismen, wie z.B. die allosterische Hemmung und die Substrathemmung, werden in Praktikum VII behandelt.

Aufgabe 1: Produktion rekombinanter Proteine in Bakterien (Fortsetzung des 2. Praktikumstages)

Bakterielle Kolonien, die auf Ampicillin-Platten gewachsen sind, sollten das Plasmid, das für ein Ampicillinresistenz-Gen kodiert, enthalten. Wir haben zwei Ansätze vorbereitet: der erste Ansatz besteht aus Bakterien, die ein Kontrollplasmid (ohne Interleukin 6-DNA) enthalten. Der zweite Ansatz besteht aus Bakterien, die ein Plasmid mit Interleukin 6-DNA enthalten. Von beiden Ansätzen wurde jeweils mit einer Kolonie eine Bakterienkultur (2 ml) angeimpft und bei einer optischen Dichte von A600 = 0,5 mit IPTG induziert. Eine weitere Kultur des zweiten Ansatzes wurde nicht induziert. Nach Induktion wurden die Bakterien für 2 h weiter bei 37°C inkubiert und anschließend durch Zentrifugation geerntet.

Isolierung und Disaggregation der "Inclusion bodies":

Das zytoplasmatisch exprimierte IL-6 wird in der Bakterienzelle als unlösliches, nicht gefaltetes Protein in sogenannten Einschlusskörpern (Inclusion Bodies) deponiert. Um reines und biologisch aktives, d.h. gefaltetes IL-6 zu erhalten, müssen zunächst die Inclusion Bodies von den löslichen bakteriellen Proteinen getrennt werden. Daraufhin müssen die in wässrigen Lösungen unlöslichen Proteine in einem **chaotropen Reagenz** gelöst werden.

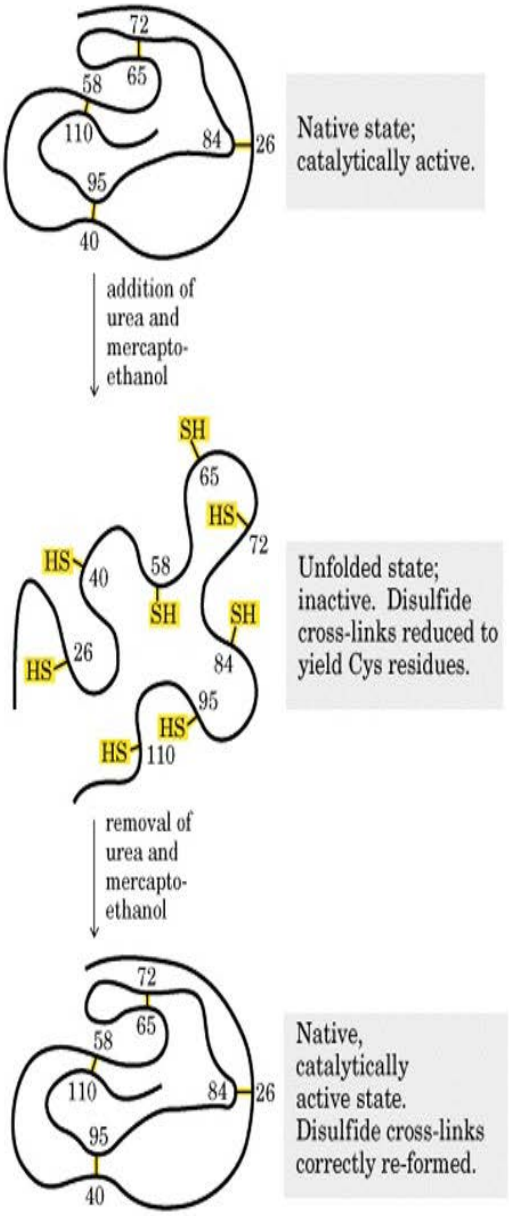
Guanidinhydrochlorid als **chaotrophes Salz** bricht die relativ geordnete Struktur des Wassers auf - erhöht also das Chaos! - und macht das Wasser damit gewissermaßen “hydrophober“. Die hydrophoben Interaktionen in Proteinen hingegen werden destabilisiert, weil die Löslichkeit der hydrophoben Seitenketten im wässrigen Medium steigt.

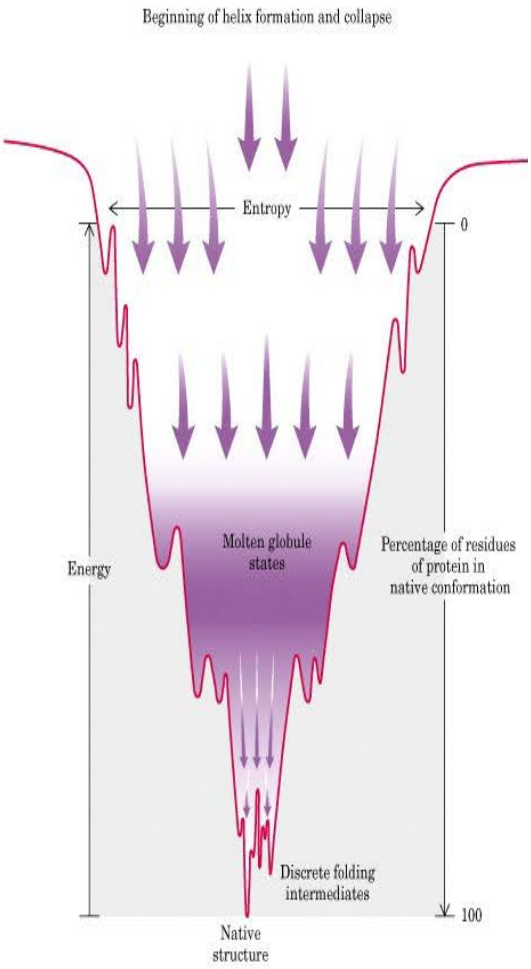
IL-6 enthält 4 Cysteine, welche im nativen Protein zwei Disulfidbrücken ausbilden. Die Gegenwart eines **Redoxsystems** führt zur korrekten, kovalenten Ausbildung dieser Disufidbrücken des IL-6.

```
  1 MNSFSTSAFG PVAFSLGLLL  VLPAAFPAPV PPGEDSKDVA APHRQPLTSS ERIDKQIRYI
 61 LDGISALRKE TCNKSNMCES SKEALAENNL NLPKMAEKDG CFQSGFNEET CLVKIITGLL
121 EFEVYLEYLQ NRFESSEEQA RAVQMSTKVL IQFLQKKAKN LDAITTPDPT TNASLLTKLQ
181 AQNQWLQDMT THLILRSFKE FLQSSLRALR QM*
```

Abbildung 12: Aminosäuresequenz von IL-6.

Renaturierung der Proteine:





Durchführung: Sie erhalten zwei Proben (zwei 1,5 ml Eppendorf-Gefäße) mit sedimentierten Bakterien, welche aus einer Expressionskultur vor, sowie 3 h nach, Induktion der Expression entnommen wurden. Diese sollen nach dem folgenden Schema behandelt werden.

Eppendorf-Gefäß (Eppi) mit Bakteriensediment

500 µl Lysis-Puffer in Eppis zugeben

resuspendieren (mittels Pipette)

10 µl von Bakteriensuspensionen abnehmen und in neue Eppis überführen (**AUFBEWAHREN!**)

NUR die Probe „3 h nach Expression„

Restliche Bakteriensuspension in flüssigem Stickstoff einfrieren und bei 37 °C auftauen (Betreuer)

Gel-Probe 1 & 2

Frier-Tau-Prozess 2x wiederholen

Zentrifugation: *full speed*, 1 min

Überstand mit Pipette abnehmen und verwerfen

1 ml Lysispuffer zum Sediment

resuspendieren (mittels Pipette)

Zentrifugation: *full speed*, 1 min

die letzten vier Schritte mit 1 ml Waschpuffer wiederholen

Überstand mit Pipette abnehmen und verwerfen

500 µl Guanidin-HCl zum Sediment geben

resuspendieren und in „Dialyse-Eppi“ überführen

Dialyse in Redoxpuffer I für 20 min

Dialyse in Redoxpuffer II für 20 min

Zentrifugation: *full speed*, 1 min

Gel-Probe 3

10 µl von Überstand abnehmen und in ein neues Eppi überführen

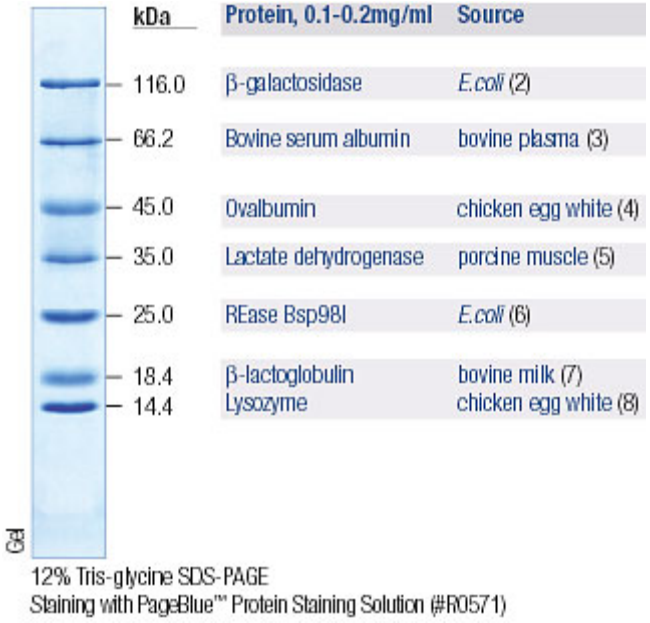
10 µl Lämmli-Puffer zu den Gelproben 1, 2 & 3 geben und

Gelproben dem Betreuer geben...

Die Bakterien werden durch das mehrfache Einfrieren und Auftauen lysiert. Das zu i*nclusion bodies* aggregierte Expressionsprotein wird dabei nicht gelöst und kann durch Zentrifugieren von den löslichen Komponenten des Zelllysates getrennt werden. Durch das Waschen in Lysispuffer bzw. Waschpuffer werden unter anderem Membranproteine entfernt. Die gewaschenen *inclusion bodies* werden nach Zusatz einer 6 M Guanidinhydrochlorid-Lösung disaggregiert/solubilisiert. Dabei liegt das Interleukin-6-Protein zwar gelöst jedoch weiterhin im denaturierten Zustand vor.
Die Renaturierung des Proteins inklusive der Ausbildung der intramolekularen Disulfidbrücken erfolgt mittels Dialyse und wird durch ein Glutathion-Redoxsystems unterstützt. Evtl. präzipitierte Proteine werden durch Zentrifugation sedimentiert. Zur Überprüfung der erfolgreichen Expression sowie Renaturierung von Interleukin-6 werden die Gelproben (1,2 & 3) mittels SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese analysiert (Betreuer).

Vorbereitung der Proben für die Polyacrylamid-Gelelektrophorese:
Die Proben werden im Verhältnis 1:1 in 2x Lämmli-Puffer aufgenommen und anschließend 5 Minuten bei 95°C inkubiert. Bis zur Gelelektrophorese (siehe 5.4) werden die Proben auf dem Labortisch aufbewahrt.

Analyse der Fragmente mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-gelelektrophorese (SDS-PAGE)
Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese ist die am häufigsten angewendete elektrophoretische Methode zur qualitativen Analyse von Proteinen. Aufgrund der Tatsache, dass vor der Elektrophorese die Proteine in einer Probe denaturiert und mit dem anionischen Detergenz Natriumdodecylsulfat gesättigt werden, erfolgt die Auftrennung im elektrischen Feld in der Polyacrylamidmatrix aufgrund ihrer Größe. Die im Gel getrennten Proteine können durch verschiedene Färbemethoden visualisiert werden.
Die Gele werden gestellt und die Analyse der Gele erfolgt durch einen Assistenten.



Lösungen:

Lysis-Puffer:	50 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 % Tween-20
Waschpuffer:	50 mM Tris-HCl pH 7,5
Guanidin-HCl:	50 mM Tris-HCl pH 8, 6 M Guanidin-HCl
Redoxpuffer 1:	50 mM Tris-HCL pH 8, 1 M Guanidin-HCl, 2 mM reduziertes Glutathion und 0,2 mM oxidiertes Glutathion
Redoxpuffer 2:	50 mM Tris-HCl pH 8,0

Aufgabe 2: pK-Wert-Bestimmung eines Puffersystems

Pufferlösungen

Wenn eine Lösung bei Zusatz von Säure oder Base ihren pH-Wert nur relativ wenig ändert, spricht man von einer Pufferlösung. Wässrige Lösungen dieser Art erhält man, indem man ein Salz einer schwachen Säure gemeinsam mit der freien Säure in Wasser löst (oder das Salz einer schwachen Base mit der entsprechenden Base). Pufferlösungen enthalten daher eine Säure und ihre korrespondierende Base in Konzentrationen gleicher Größenordnung (z.B. CH_3COOH / CH_3COO^- ; NH_4^+ / NH_3 ; $H_2PO_4^-$ / HPO_4^{2-}) . Die schwache Säure $H_2PO_4^-$, die zum Beispiel beim Auflösen von Kaliumhydrogenphosphat entsteht, hat einen pK-Wert von 6,8.

Mit dem Massenwirkungsgesetz, angewendet auf die Dissoziation schwacher Säuren, kann man den pH-Wert von Pufferlösungen berechnen:

$$K_a = \frac{c_{H^+} \cdot c_B}{c_A}$$

Diese Gleichung, logarithmiert und nach pH aufgelöst, wird nach Henderson und Hasselbalch benannt:

$$pH = pK + \log\left(\frac{c_B}{c_A}\right)$$

C_A = Konzentration der Säure, C_B = Konzentration der korrespondierenden Base.

Durch Mischen einer Säure von geeignetem pK mit ihrer korrespondierenden Base kann man also Pufferlösungen jeden gewünschten pH-Wertes herstellen.

Benötigte Lösungen:

Dihydrogenphosphat-Lösung	0,1 M KH_2PO_4 ad 1000 ml mit Aqua bidest.
Hydrogenphosphat-Lösung	0,1 M Na_2HPO_4 ad 1000 ml mit Aqua bidest.

Durchführung:

1. 11 markierte Plastik-Reagenzröhrchen werden nach folgendem Schema gefüllt (Röhrchen mit Zahlen markieren!):

Ansatz	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**
Dihydrogenphosphat-Lösung [ml]	8,0	7,5	7,0	6,0	5,0	4,0	3,0	2,0	1,0	0,5	-
Hydrogenphosphat-Lösung [ml]	-	0,5	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	7,0	7,5	8,0

2. Die Lösungen werden gemischt, indem man die Röhrchen mit einem Stopfen verschließt und dreimal kippt.
3. Anschließend wird der pH-Wert potentiometrisch gemessen (Elektrode nach jeder Messung mit Aqua bidest. abspülen!).

Aufgabe 3: pH-Optimum einer Phosphatase

Phosphatasen (genauer Phosphomonoester-Hydrolasen) sind häufig auch gegenüber einfachen, synthetischen Substraten, wie z.B. *p*-Nitrophenylphosphat, aktiv. Die Hydrolyse dieses Substrates kann sehr leicht gemessen werden, da das entstehende Nitrophenol in alkalischer Lösung gelb gefärbt ist (Absorbtionsmaximum bei ca. 400 nm):

Benötigte Lösungen:

Puffer-Lösungen	
***p*-Nitrophenyl-phosphat-Lösung**	1 mM *p*-Nitrophenylphosphat in Acetatpuffer
Natronlauge	1 M NaOH in Aqua bidest.
Phosphatase	Konzentration wird vom Betreuer mitgeteilt. Die Enzymlösung muss während der gesamten Versuchsdauer auf Eis aufbewahrt werden.

Durchführung:

1. Je 4,5 ml der ausgestellten Pufferlösungen von pH 2 bis 8 werden mit je 4 ml *p*-Nitrophenylphosphat-Lösung vermischt und etwa 3 Minuten bei 37°C temperiert. Zum Mischen werden die Röhrchen mit Stopfen verschlossen und dreimal gekippt.
2. Dann wird in Abständen von genau 30 Sekunden je 500 µl Enzymlösung zupipettiert, erneut dreimal gekippt und sofort wieder in das 37°C-Bad gestellt.
3. Nach genau 10 Minuten Reaktionszeit werden dann wieder im Abstand von 30 Sekunden den Ansätzen je 1 ml Natronlauge zugemischt und wieder dreimal gekippt, wodurch die enzymatische Reaktion beendet und ein einheitlicher, alkalischer pH-Wert erzeugt wird.

   Bei richtiger Ausführung beträgt die Inkubationszeit mit dem Enzym bis zum Stop der Reaktion mit der Natronlauge in jedem Ansatz genau 10 Minuten.
4. Für den Leerwert werden in einem weiteren Röhrchen 4.5 ml Puffer (pH 7,0), 500 µl Aqua bidest., 4 ml *p*-Nitrophenylphosphat-Lösung und 1 ml Natronlauge gemischt. Der Leerwert wird nicht bei 37 °C inkubiert.

5. Je 1 ml der Mischungen werden in Kunststoff-Küvetten bei 405 nm gegen den Leerwert gemessen. Sollte die gemessene Extinktion größer als 1.0 sein, muss die entsprechende Probe verdünnt und die Messung wiederholt werden.

Aufgabe 4: Elektrophoretische Auftrennung von menschlichem Serum

In diesem Praktikum sollen Serumproteine auf Celluloseacetatfolie bei pH 8,8 elektrophoretisch getrennt werden. Da bei diesem pH-Wert mit Ausnahme einiger weniger Immunglobuline alle Serumproteine zur Anode wandern, wird das Serum nahe der Kathode aufgetragen. Die Streifen werden nach der Elektrophorese einer allgemeinen Proteinfärbung unterzogen.

Benötigte Materialien:

Tris-Barbiturat-Puffer	66 mM Barbitursäure ad 1000 ml mit Tris [Tris(hydroxymethyl)aminomethan] eingestellt auf pH 8,8
Celluloseacetat-streifen	
Serum	Verschiedene unverdünnte Seren in Tropfen auf Objektträgern (werden im Verlauf des Kurses ausgeteilt)
Färbelösung	Amidoschwarz in Eisessig-Methanol-Gemisch
2 x Entfärbelösung	Eisessig-Methanol-Gemisch (ohne Amidoschwarz)

Durchführung

Achtung!

- Bitte die Vorschrift vor Arbeitsbeginn bis zum Ende durchlesen! Die Celluloseacetat-Streifen bitte ausschließlich mit Pinzetten berühren!
- Die Abnahme des Deckels von der Elektrophoresekammer hat automatisch eine Unterbrechung des Stromflusses zur Folge!
- Die Elektrophoresekammer muss derart mit Puffer gefüllt sein, dass der

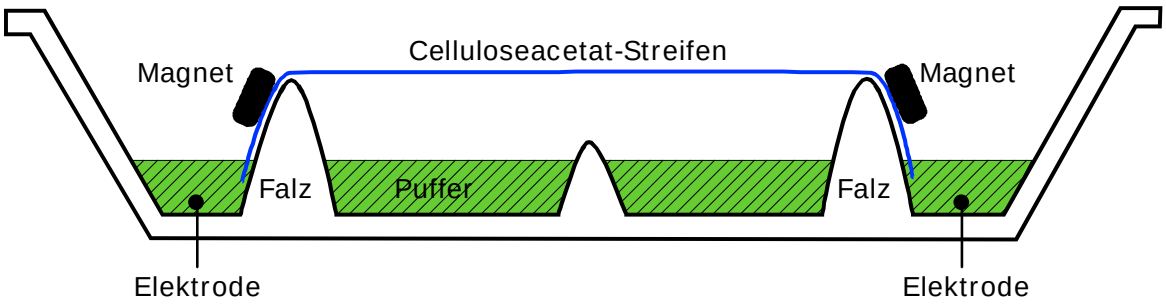


Abbildung 13: Schematische Ansicht einer Elektrophoresekammer.

Pufferpegel in beiden Teilkammern gleich hoch steht. Dies wird durch einseitiges Anheben einer Schmalseite der Elektrophoresekammer erreicht.

1. Der weiße Celluloseacetat-Streifen wird an einer Ecke mit einem **Kugelschreiber** mit dem Namen versehen, danach an einem Ende erfasst und – mit dem freien Ende voran – vorsichtig auf die Pufferlösung gelegt, wobei keinesfalls Luftblasen zwischen dem Streifen und dem Puffer bleiben dürfen.
2. Nach mindestens 10 Minuten ist der Streifen ausreichend mit Puffer vollgesogen. Er wird dann mit Hilfe der Pinzetten kurz zwischen zwei Filterpapieren von überschüssigem Puffer befreit und danach über die äußeren Falze der Elektrophoresekammer gespannt (siehe Abbildung 13). Fixiert wird der Streifen rechts und links durch zwei kleine Magnete. Die Folienenden müssen unbedingt in die Pufferlösung in beiden Teilkammern eintauchen!

3. Die Elektrophoresekammer wird nach Einlegen des Streifens bis zum Auftragen des Serums durch den Deckel der Kammer geschlossen gehalten, um ein Austrocknen des Celluloseacetat-Streifens zu vermeiden.
4. Sobald alle Arbeitsgruppen eines Tisches ihre Streifen in die Elektrophoresekammer gebracht haben, werden die Serumproben **unmittelbar nacheinander** auf jeden Streifen aufgetragen. Hierzu wird eine Auftragsbrücke über den Streifen gesetzt, so dass die Farbmarkierungen an der Brücke mit denen an der Elektrophoresekammer übereinstimmen. Die Aussparung am schwarz markierten Ende der Auftragsbrücke muss in den Falz einrasten.
5. Zum Auftragen der Probe wird ein Auftragsstempel benutzt. Bei Druck auf dessen Taste bis zum Anschlag ragt an seiner Unterseite eine Öse heraus. Deren Unterseite wird mit der jeweiligen Serumprobe ausreichend benetzt, indem sie horizontal über die Oberfläche eines Serumtropfens gestreift wird. Der Ösensteg darf nicht in das Serum eintauchen!
6. Nach dem Benetzen soll die Taste langsam in die Ausgangsstellung zurückgleiten. Der Auftragsstempel wird mit der vorderen Nut in das mit 1 gekennzeichnete Loch der Auftragsbrücke gesetzt, danach die Taste erneut gedrückt, so dass das an der Öse haftende Serum auf den Celluloseacetat-Streifen übertragen wird.
7. Sofort danach wird die Öse (**nur diese!**) mit Aqua bidest. gespült und mit Filterpapier trockengetupft.
8. Nach Beendigung des Auftragens wird die Elektrophoresekammer mit dem Deckel so verschlossen, dass seine Markierung mit der der Elektrophoresekammer übereinstimmt.
9. Die Zuleitungen werden an die gekennzeichneten Gleichstrombuchsen am Arbeitsplatz angeschlossen (rot = Anode; schwarz = Kathode). **Es liegt dann eine Spannung von 250 V an.**
10. 40 Minuten nach Anlegen der Gleichspannung wird der Strom unterbrochen und der Streifen in möglichst horizontaler Lage aus der Elektrophoresekammer genommen.

Proteinfärbung:

1. Der Streifen wird für 5 Minuten in Färbelösung 1 gelegt.
2. Danach wird er jeweils für 5 Minuten nacheinander in die beiden Entfärbebäder gebracht.
3. Aus dem letzten Bad wird die Folie auf einen Objektträger gelegt, mit einer Walze leicht angedrückt und anschließend für 10 Minuten in einen 60°C warmen Trockenschrank gelegt.
4. Sobald der Streifen transparent geworden ist, wird er im Photometer Eppendorf ausgewertet.

Auswertung:

Bestimmen Sie die Verteilung der einzelnen Serumproteine. Versuchen Sie anhand der unten aufgeführten Beispiele das Proteinprofil einer Erkrankung zuzuordnen.

Diagnostische Bedeutung der Serumproteine

Die Elektrophorese des Serums Gesunder ergibt unter den Bedingungen des Versuches 4 bei der photometrischen Auswertung des Streifens das folgende, typische Bild:

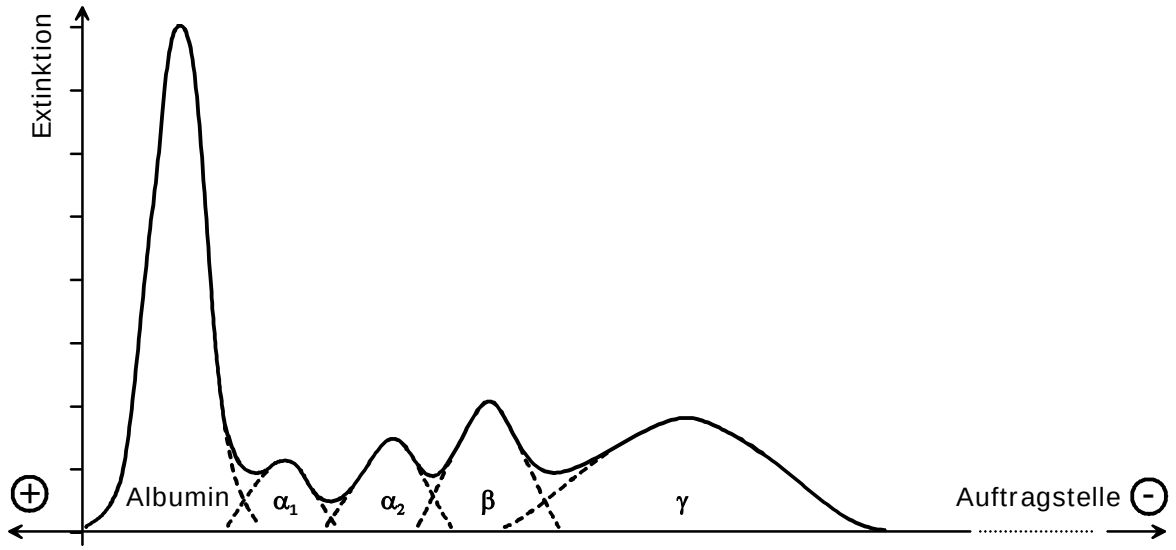


Abbildung 14: Elektropherogramm von humanem Normalserum.

Die meisten Serumproteine, außer Serumalbumin, sind Glykoproteine. Die isoelektrischen Punkte liegen vorwiegend zwischen 4 und 6 (der IEP des Serumalbumins ist 4,9). Das Albumin ist die hier am schnellsten wandernde Serumproteinfraktion. Das noch rascher wandernde Präalbumin ist bei dieser Technik meist nicht erkennbar. Alle übrigen Fraktionen, die bei der Elektrophorese langsamer als das Albumin wandern, werden als Globuline bezeichnet. Sie werden üblicherweise in α_1-, α_2-, β- und γ- Globuline unterteilt. Alle Globulinfraktionen sind inhomogen, d.h. bestehen aus jeweils mehreren unterschiedlichen Proteinen. Die γ-Globulin-Fraktion setzt sich fast ausschließlich aus Immunglobulinen zusammen.
In der klinischen Chemie kann lediglich das makrochemische Bild der Blutproteine erfasst werden. Bei der Beurteilung dieses Blutproteinbildes ist es wichtig, erstens

die Gesamtproteinkonzentration (normal 5,5-8,0 g/100 ml Serum) und zweitens den relativen Anteil der einzelnen Serumproteinfraktionen zu berücksichtigen. Veränderungen des Gesamtproteingehaltes im Blut werden bezeichnet mit:

a) Hyperproteinämie (über 8,0 g Protein/100 ml Serum)
b) Hypoproteinämie (unter 5,5 g Protein/100 ml Serum)

Eine echte Vermehrung aller Serumproteine über die Norm wird nicht beobachtet. Bei pathologischen **Hyperproteinämien** sind stets nur eine oder wenige Proteinkomponenten, z.B. γ-Globulin, vermehrt. Hyperproteinämien sind daher stets auch **Dysproteinämien** oder „**Paraproteinämien**“.

Hypoproteinämien kommen durchaus vor. Sie führen über eine Abnahme des kolloidosmotischen Druckes zur Ödembildung. Besteht gleichzeitig Mangel an spezifischen Proteinen, können Funktionsausfälle auftreten, z.B. Infektneigung bei Immunglobulinmangel. Häufigste Ursache einer Hypoproteinämie ist ein vermehrter Verlust von Protein. Seltene Ursachen einer Hypoproteinämie sind genetisch bedingte Defekte. Diese stellen gleichzeitig Dysproteinämien dar.

Der Begriff **Dysproteinämien** definiert eine verschobene Mengenrelation normaler Proteine. Allen Dysproteinämien ist gemeinsam, dass bei Vermehrung einer oder mehrerer Globulinfraktionen die Albuminfraktion relativ abnimmt, woraus auf eine einseitig inverse Regulierung von Albumin und Globulin geschlossen werden kann.

Als „**Paraproteinämie**“ wird das Auftreten neuartiger, bis zu einem bestimmten Zeitpunkt im Organismus nicht vorhandener Proteine definiert. In dieser Form ist der Begriff fragwürdig geworden, da als „Paraproteine“ bezeichnete Proteine durchaus im Normalfall vorkommen, wie beispielsweise alle Immunglobuline Plasmazellen entstammen. Im Rahmen einer „Paraproteinämie“ treten Immunglobuline nur deswegen vermehrt auf, weil eine Plasmazelle carzinomatös entartet ist, sich klonal vermehrt hat – was Plasmazellen im Normalzustand, wenn keine Entzündung vorliegt, nicht tun – und zusammen mit ihren Tochterzellen unabhängig vom Bedarf Immunglobuline synthetisiert und ins Blut sezerniert. Der Zustand der carzinomatösen Vermehrung der Plasmazellen heißt **Plasmocytom**.

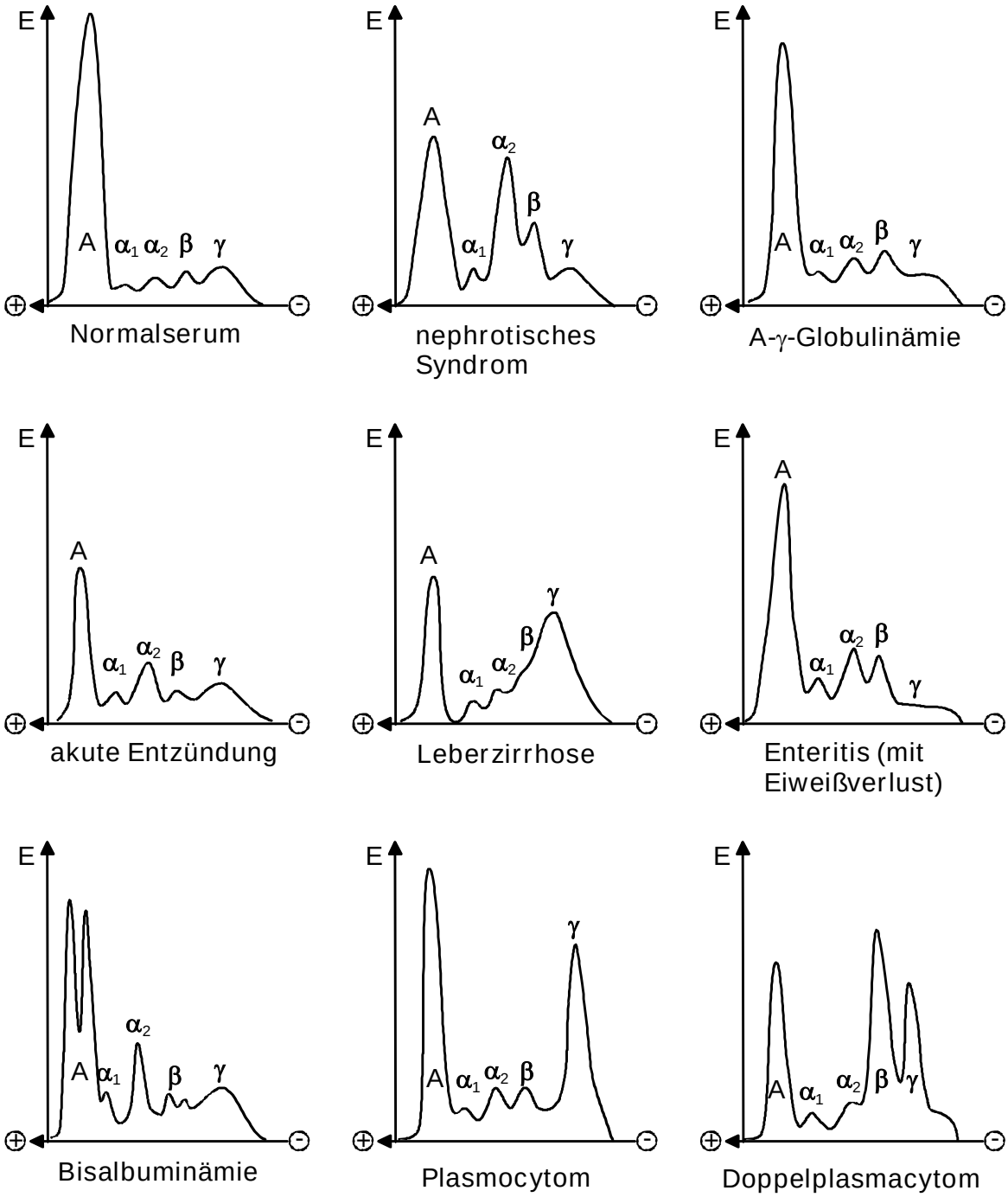


Abbildung 15: Elektropherogramme von Serumproteinen bei verschiedenen Erkrankungen (A = Albumin)

Aufgabe 5: K_M und v_{max} einer sauren Phosphatase für p-Nitrophenylphosphat, kompetitive Hemmung

Benötigte Lösungen:

Acetat-Puffer	
***p*-Nitrophenyl-phosphat-Lösung (*p*-NPP)**	1 mM *p*-Nitrophenylphosphat in Acetatpuffer
Glycerophosphat	20 mM Glycerophosphat in Acetatpuffer
Natronlauge	1 M NaOH in Aqua bidest.
Phosphatase	Konzentration wird vom Betreuer mitgeteilt. Die Enzymlösung muss während der gesamten Versuchsdauer auf Eis aufbewahrt werden.

Durchführung:

1. 17 Kunststoff-Röhrchen werden nach folgender Tabelle beschickt:

Ansatz	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**	**13**	**14**	**15**	**16**	**LW**
Acetat-Puffer [ml]	1	1	-	-	3	3	2	2	3,5	3,5	2,5	2,5	4	4	3	3	1
***p*-NPP [ml]**	4	4	4	4	2	2	2	2	1,5	1,5	1,5	1,5	1	1	1	1	4
Glycerophosphat [ml]	-	-	1	1	-	-	1	1	-	-	1	1	-	-	1	1	1

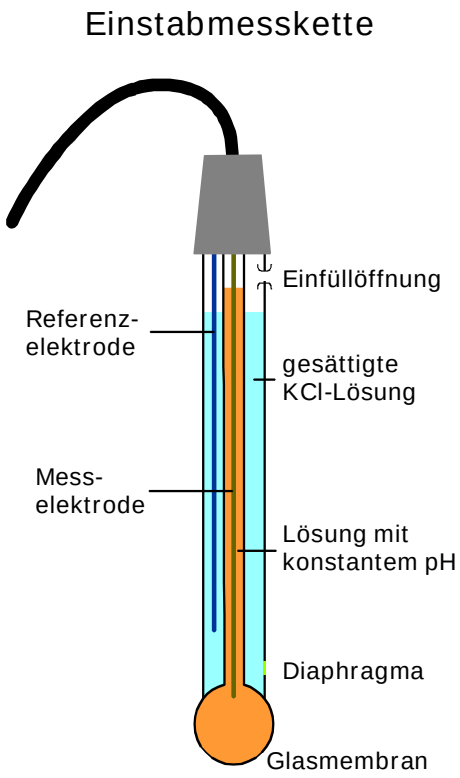
2. Die Kunststoff-Röhrchen werden für 3 Minuten bei 30°C im Wasserbad temperiert.
3. Dann wird in allen Röhrchen **bis auf den Leerwert (LW)** die Reaktion in Abständen von genau 30 Sekunden durch Zugabe von je 1 ml Phosphatase gestartet. Das Reaktionsgemisch muss dazu sofort mit je einem Plastikspatel gut durchmischt werden.

4. Jeweils nach 10 Minuten bei 30°C wird die Reaktion durch Zugabe von je 4 ml Natronlauge gestoppt.
5. Je 1 ml der Mischungen werden in Kunststoff-Küvetten bei 405 nm gegen den Leerwert gemessen. Sollte die gemessene Extinktion größer als 1.0 sein, muss die entsprechende Probe verdünnt und die Messung wiederholt werden.

.

Anhang

Die Glaselektrode



Zwischen der inneren und äußeren Oberfläche einer aus einem dünnwandigen Spezialglas (Glasmembran) hergestellten Glaskugel, die mit einer Lösung bekannten pH-Wertes (meist HCl/KCl pH 2) gefüllt ist, entsteht eine Potentialdifferenz, deren Größe dem Unterschied der pH-Werte innerhalb und außerhalb (unbekannter pH der Messlösung) der Kugel proportional ist. Zur Messung der Potentialdifferenz werden in die Innen- und in die Außenlösung je eine Ableitelektrode eingetaucht. Um definierte Potentiale an der äußeren Ableitelektrode zu schaffen, wird sie in eine gesättigte KCl-Lösung getaucht, die über eine Fritte (Diaphragma) elektrisch leitend mit der Messlösung verbunden ist. KCl-Lösung wird gewählt, da einerseits die Ableitelektrode davon nicht vergiftet (verändert) wird und andererseits KCl beim Herausdiffundieren durch die Fritte ein annähernd konstantes elektrisches Diffusionspotential erzeugt. Übliche Glaselektroden verwenden als Ableitelektroden Ag/AgCl-Elektroden oder Hg/Hg_2Cl_2-(Kalomel)-Elektroden.

Für pH-Wert-Bestimmungen werden üblicherweise Einstabmessketten verwendet, bei denen beide Ableitselektroden klein ausgeführt und in einem doppelwandigen Glasrohr untergebracht sind. Die Glasmembran wird aus besonderen Glasarten hergestellt, bei denen das Potential allein durch H^+-Ionen bestimmt wird. Erst hohe Konzentrationen von Na^+ oder K^+ wirken störend (Alkalifehler). Eliminiert man rechnerisch oder apparativ durch Kalibrieren aus der gesamten gemessenen Potenzialdifferenz das Eigenpotential der Ableitelektroden, so bekommt man die an den Glasoberflächen auftretende Potenzialdifferenz. Sie kann auf der Skala des Voltmeters direkt in pH-Einheiten abgelesen werden.

Benutzen Sie die Glaselektroden erst nach einer Einweisung durch einen Assistenten!

Praktische Aufgaben 1 bis 5

Praktikumsgruppe:

Namen des Praktikanten:

Aufgabe 1: Produktion rekombinanter Proteine in Bakterien

Diskussion der Ergebnisse

.....

.....

.....

.....

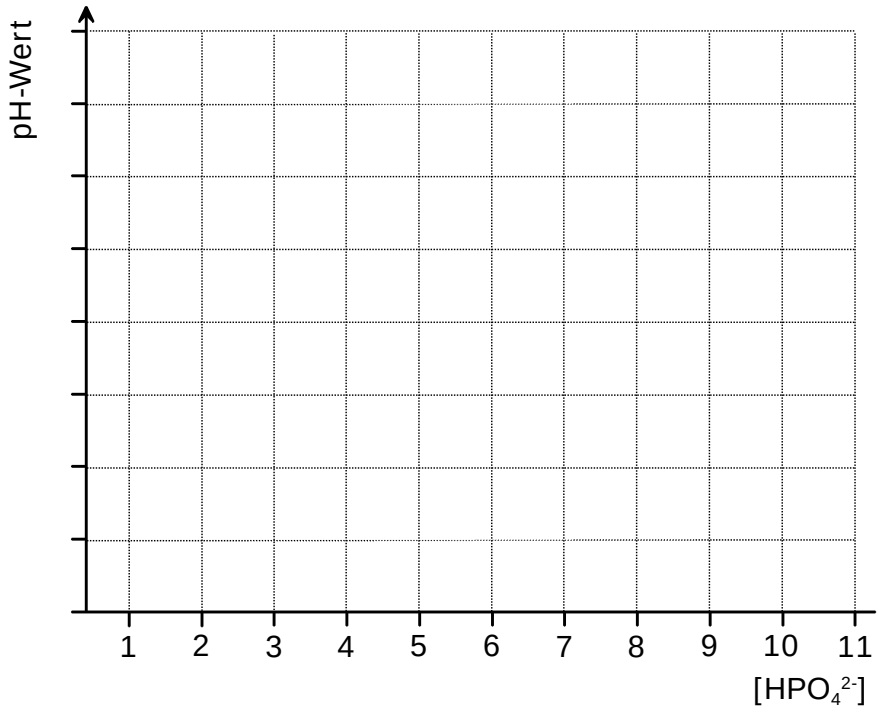
.....

Aufgabe 2: pK-Wert-Bestimmung eines Puffersystems

Messwerte:

Ansatz	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**
pH-Wert											

Zeichnen Sie die gemessenen pH-Werte (Ordinate) gegen die relative Konzentration an **HPO_4^{2-}** (Abszisse) im folgenden Diagramm auf.



Bestimmen Sie aus der Kurve den pK-Wert von **H_2PO_4**.

.....

Was ist ein Puffer? Was ist ein pK-Wert?

Diskussion der Ergebnisse:

.....

.....

.....

.....

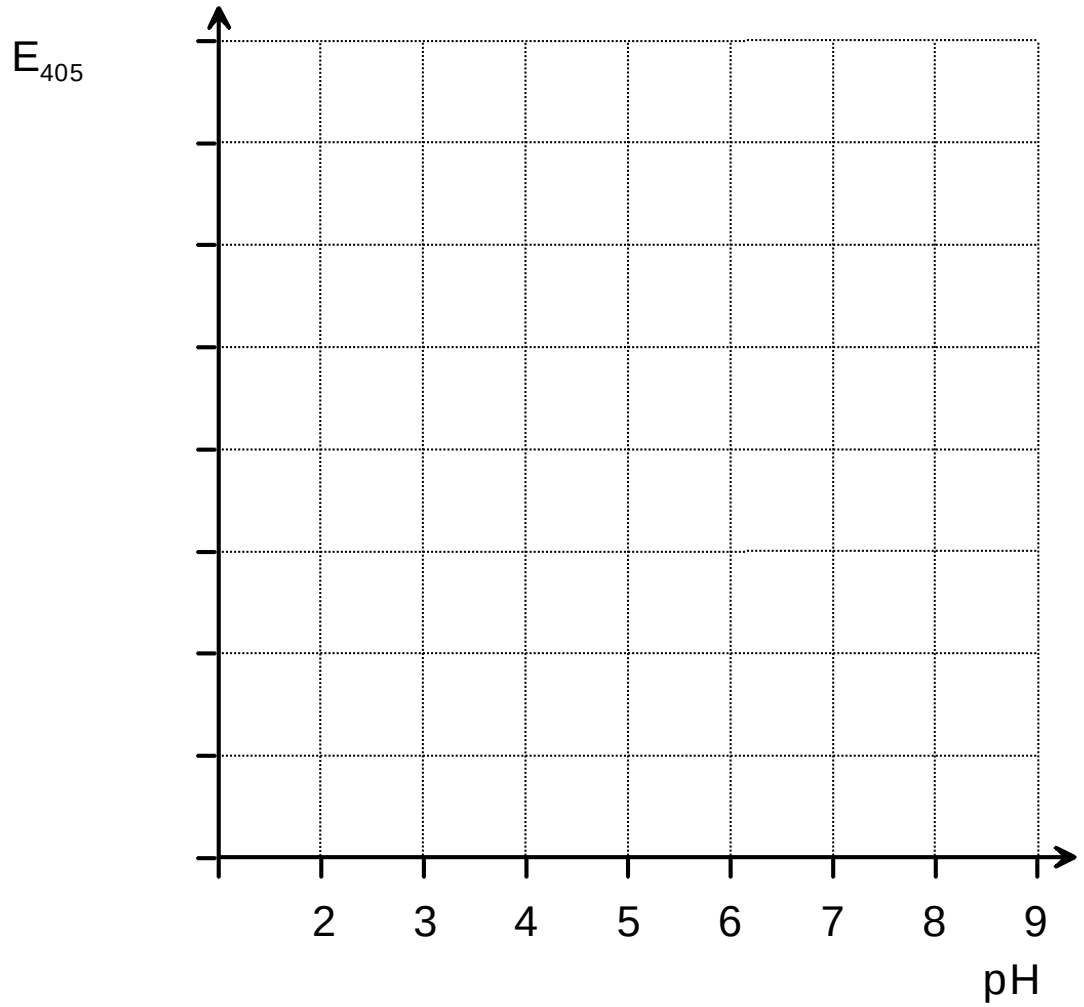
.....

Aufgabe 3: pH-Optimum einer Phosphatase

Messwerte:

pH-Wert	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**
Mess-wert							

Die erhaltenen Extinktionen (Ordinate) werden graphisch gegen die pH-Werte



(Abszisse) aufgetragen.

Berechnen Sie die Enzymaktivität pro ml der gemessenen Phosphatase im pH-Optimum. Der molare Extinktionskoeffizient des *p*-Nitrophenolat ist ε_{405} = 18200 l mol^{-1} cm^{-1}. Verwenden Sie zur Berechnung der Konzentrationen das Lambert-Beer´sche Gesetz. Formel von Seite 58 verwenden.

Wann gilt das Lambert-Beer´sche Gesetz?

Berechnen Sie die spezifische Aktivität.

Definition: 1 U ist gleich 1 µmol umgesetztes Substrat pro Minute.

.....

.....

Rechenweg und Diskussion der Ergebnisse:

Aufgabe 4: Elektrophoretische Auftrennung von menschlichem Serum

Zeichnen Sie die Verteilung der einzelnen Serumproteine.

Versuchen Sie anhand der in der Einleitung aufgeführten Beispiele das Proteinprofil einer Erkrankung zuzuordnen. Welches Profil trifft am ehesten das ihrer Probe?

.....

Diskussion der Ergebnisse:

.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....

Aufgabe 5: K_M und v_{max} einer sauren Phosphatase für p-Nitrophenylphosphat, Kompetitive Hemmung

Messwerte:

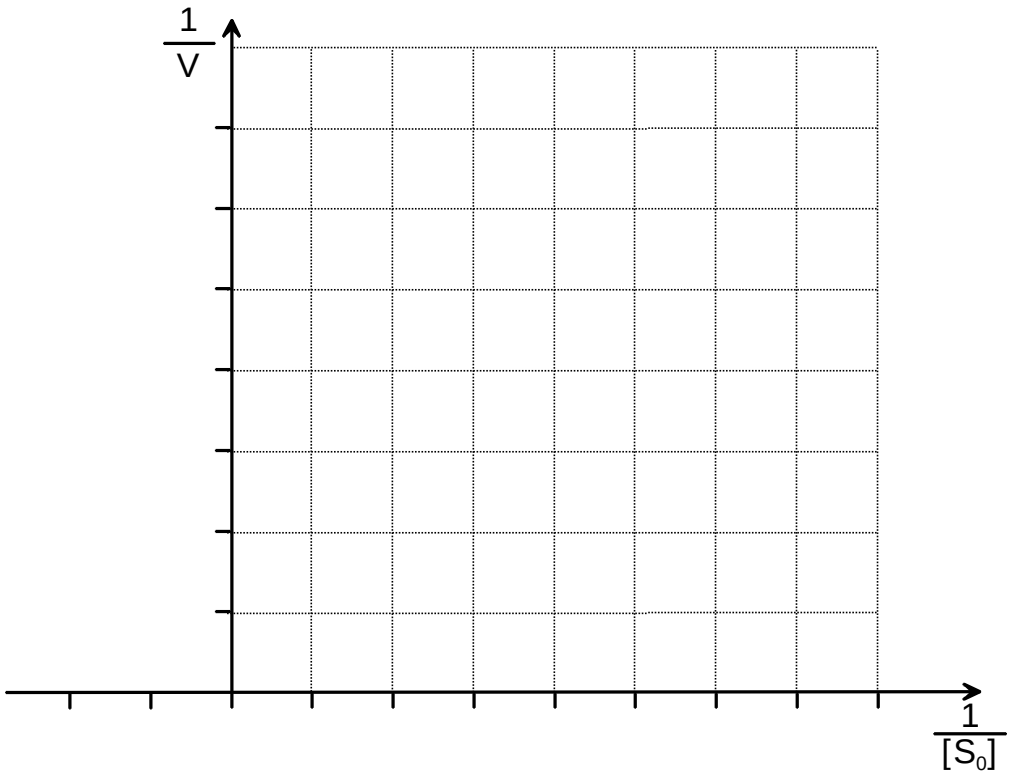
Ansatz	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**	**13**	**14**	**15**	**16**
Extinktion																
Mittelwerte																
Produktkonz.																

Nach Bildung der Mittelwerte (1+2, 3+4, usw.) berechnen Sie mit Hilfe des molaren Extinktionskoeffizienten von *p*-Nitrophenolat (ε = 18200 l mol^{-1} cm^{-1}) die Produktkonzentration [P] (in mol/l) der Ansätze (auch hier wieder mit Lambert-Beer!).
Nachfolgend wird die Geschwindigkeit der Reaktion einbezogen. Als Geschwindigkeit v dient die pro Minute im Ansatz (10 ml) gebildete Menge des Produktes, also

$$v = \frac{[P](mol/l) \cdot 10ml}{10\,\min}$$

Die Substratkonzentration [S] berechnen Sie aus der Konzentration der *p*-Nitrophenyl-phosphat-Lösung (1mM), der Reaktionsansatz entspricht 10 ml.
In der Auftragung nach Lineweaver und Burk müssen sich die Messpunkte zu zwei Geraden ordnen: Glycerophosphat wirkt wie ein kompetitiver Inhibitor, da es reversibel an das aktive Zentrum gebunden wird und mit *p*-Nitrophenylphosphat konkurriert. Dabei ist gleichgültig, dass auch das Glycerophosphat selbst umgesetzt wird, denn die dabei entstehenden Produkte werden nicht gemessen.

Ansatz	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**	**13**	**14**	**15**	**16**
1/v																
S **1/S**																



Berechnen Sie die Dissoziationskonstanten K_D für die inhibierte und nicht inhibierte Reaktion.

.....

Was ist v_{max}? Welche Bedeutung hat K_M? Was ändert sich bei einer reversiblen Hemmung -v_{max} oder K_M?

.....

.....

Diskussion der Ergebnisse:

.....

.....

.....

.....

BIOCHEMISCHES PRAKTIKUM IV

Kohlenhydrate und Lipide: Aufbau, Eigenschaften und Funktionen

Aufgabe 1: **Chemische und enzymatische Hydrolyse von Stärke**

Aufgabe 2: **Nachweis der Blutgruppendeterminanten des AB0-Systems mit Glycosidasen**

Aufgabe 3: **Trennung der Isoenzyme von Lactat-dehydrogenase (LDH) durch Elektrophorese**

Aufgabe 4: **Qualitativer Nachweis der Succinat-Dehydrogenase-Aktivität in Rattenleber-mitochondrien**

Aufgabe 5: **Aktivierung der Pankreaslipase durch Gallen-säuren**

Aufgabe 6: **Bestimmung von Glucose und Insulin vor und nach oraler Glucose-Belastung**

Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
Biochemisches Institut
In der Medizinischen Fakultät
Olshausenstrasse 40, 24098 Kiel

Stichworte

Kohlenhydrate:

- Struktur von Monosacchariden (Aldosen, Ketosen; Glucose, Galactose, Fructose, Neuraminsäure), Disacchariden (Saccharose, Lactose), Polysacchariden (Stärke, Amylose, Amylopectin, Glycogen), Zuckerphosphaten, Ascorbinsäure, ATP, ADP, AMP, $NADH+H^+$, $NADPH+H^+$, $FADH_2$
- Hydrolyse, Tautomerie, Mutarotation, Redoxreaktionen
- Funktion von Kinasen, Hydrolasen, Dehydrogenasen
- Wirkung und Spezifität von Disaccharasen u.a. Glycosidasen, Amylasen
- Blutgruppendeterminante Substanzen
- Glycoproteine (Strukturprinzip, Bausteine)
- Glucose und Insulin

Lipide:

- Fettsäuren, Triglyzeride, Phospholipide
- Lipoproteine als Transportvesikel
- Lipoproteinstoffwechsel

Katabolismus:

- Isoenzyme: Definition, diagnostische Bedeutung; Lactatdehydrogenase
- Citratcyclus, Glycolyse, Atmungskette, Milchsäuregärung
- Wirkungen von KCN und Entkopplern auf die Atmungskette

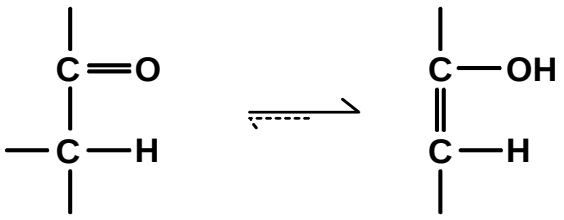
Methoden:

- Reduktionsproben auf Zucker
- Jodreaktion auf Polysaccharide
- Glucose-Oxidase, Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase
- Elektrophorese
- Triacylglycerinspaltung
- Glucosebestimmung

Einleitung

Gegenstand des ersten Teils dieses Praktikums sind zunächst Struktur, Nachweis, Spaltung und Eigenschaften einfacher und zusammengesetzter Kohlenhydrate (Aufgaben 1 und 2).
Im zweiten Teil des Praktikums werden Aufgaben mit Enzymen durchgeführt, die in zentralen intrazellulären Abbauwegen eine wichtige Rolle spielen, nämlich in der Glycolyse (Aufgabe 3) und im Citratcyclus sowie der Atmungskette (Aufgabe 4). Das in Aufgabe 3 untersuchte Enzym Lactatdehydrogenase (LDH) ist zugleich das bekannteste Beispiel für das Phänomen der Isoenzyme, die heute in der klinischen Diagnostik eine große Rolle spielen.
Im dritten Teil des Praktikums (Aufgabe 5) werden die Pankreaslipase und ihre Aktivierung durch Gallensäuren untersucht.
Im vierten Teil des Praktikums (Aufgabe 6) werden die zeitliche Veränderung der Glucose-Konzentration, nach oraler Glucose-Belastung, und der Zusammenhang der Glucose- und Insulin-Konzentration im Serum eines fiktiven Patienten untersucht.

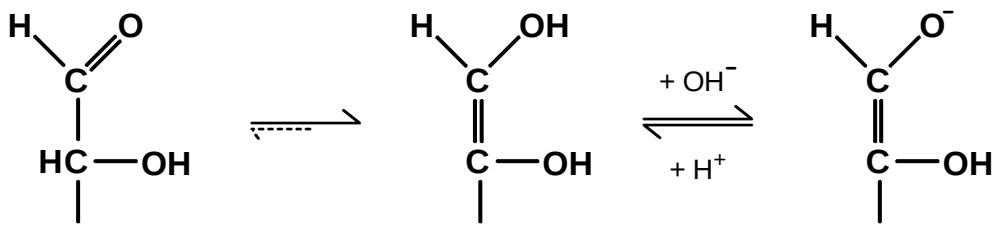
Nachweis von Monosacchariden mit Reduktionsproben



Carbonyl-Form Enol-Form

Carbonylverbindungen stehen im tautomeren Gleichgewicht mit ihren Enolen.
Das Gleichgewicht liegt weit auf der Seite der Carbonyl-Form. Enole sind jedoch ziemlich starke Säuren, durch Zufügen von OH^--Ionen werden sie ionisiert und

dadurch aus obigem Gleichgewicht „entfernt“. Trägt das der Carbonylgruppe benachbarte C-Atom eine OH- Gruppe (α-Ketol-Gruppierung), wie das bei den Zuckern der Fall ist, so gelangt man entsprechend zu Endiolaten.



Carbonyl-Form Endiol-Form Endiolat-Anion

Es ist zu beachten, dass die Endiolisierung im alkalischen Milieu nur aus der offenkettigen Form erfolgt, dem obigen Gleichgewicht also noch das Mutarotations-Gleichgewicht vorgelagert ist.

Endiole wirken stark reduzierend, man nennt sie deshalb auch Reduktone. Durch Erhitzen im alkalischen Medium wird schließlich die Kette in unübersichtlicher Reaktion zu kleineren Bruchstücken, die außerordentlich stark reduzierend wirken, aufgespalten. Diese starke Reduktionswirkung nutzen die sogenannten „Reduktionsproben“ auf Zucker zum qualitativen Nachweis aus, indem sehr schwache Oxidationsmittel, wie z.B. Cu^{2+}, oder BiO^{+}, reduziert werden.

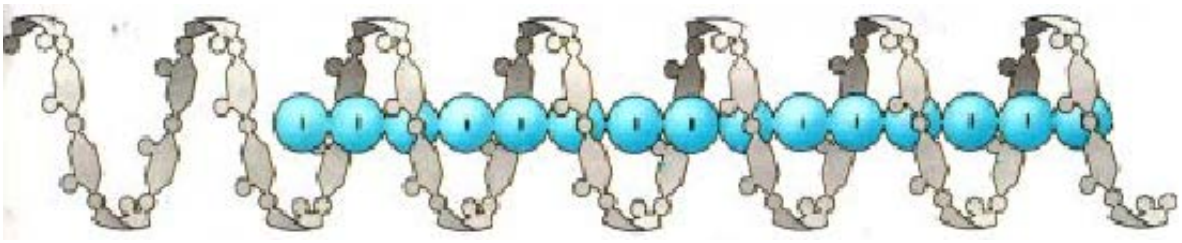
Bei der Trommer´schen Probe läuft folgender Vorgang ab: 2-wertiges Cu^{2+} wird durch Glucose zu 1-wertigem Cu^{+} reduziert. Es entsteht zunächst Kupfer(I)hydroxid CuOH (gelb), dann durch Wasserabspaltung Kupfer(I)oxid Cu_2O (rot). In dem für die Reaktion notwendigen alkalischen Milieu fällt Cu^{2+} als schwer lösliches Hydroxid aus. In dem 2-Phasensystem (festes Hydroxid + flüssige Glucoselösung) würde die Reduktionsreaktion nur langsam ablaufen, das voluminöse Hydroxid und das aus diesem durch Dehydratisierung beim Erhitzen entstehende schwarze Kupfer(II)oxid CuO würden außerdem die Erkennung des Farbumschlages verhindern. Deshalb sorgt man dafür, dass das Schwermetallion als alkalibeständige, lösliche Komplexverbindung vorliegt. Komplexbildner ist der zu bestimmende Zucker. Da dieser in relativ geringer Konzentration vorliegt, muss man mit sehr kleinen Cu^{2+}-Mengen arbeiten.

Anmerkung:

Da eine freie acetalische Hydroxylgruppe Voraussetzung für eine positive Reaktion nach Trommer ist, geben einige Zuckerphosphate (welche?) die Reaktion nicht. Ascorbinsäure ist ein natürliches Redukton und reagiert daher erwartungsgemäß bereits in der Kälte.

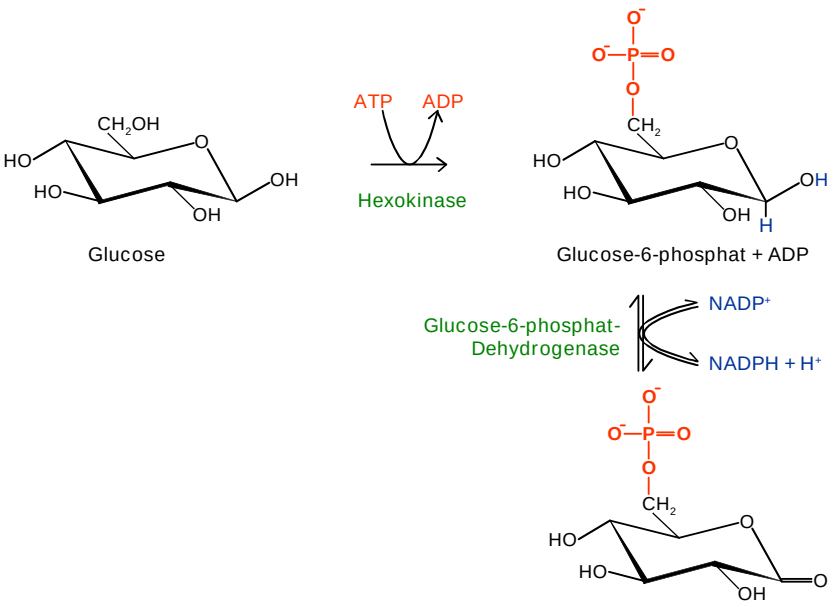
Nachweis von Stärke (zu Aufgabe 1)

Ein direkter, sehr empfindlicher Nachweis von Polysacchariden mit α-glycosidischer Verknüpfung (Stärke, Glycogen) ist durch molekulares Jod J_2, möglich. Das Jod lagert sich in die spiraligen Kettenstrukturen ein (Einschlussverbindung, Clathrat).



Amylose gibt eine blaue, Amylopectin und Glycogen eine braune Färbung.

Spezifische Nachweise für Glucose auf enzymatischem Wege



a) über Glucose-6-phosphat: Glucose wird mit Hexokinase zu Glucose-6-phoshat umgesetzt, letzteres zum 6-Phospho-glucono-δ-lacton oxi-diert. Das hier wirksame Enzym Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase ist absolut

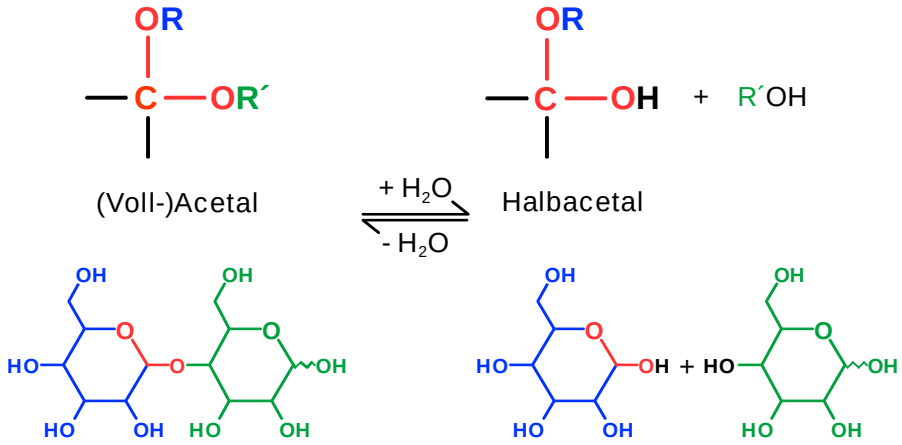
substratspezifisch. Die Reaktion ist im Körper einer der wenigen Lieferanten von NADPH+H$^+$.

b) direkte Oxidation (siehe Aufgabe 2)

Aus Pilzen gewonnene, mit dem Coenzym FAD arbeitende Enzyme (Glucose-Oxidasen) werden in den „Glucoseteststreifen“ verwendet. Eine angeschlossene Reaktion, in der entstehendes H_2O_2 zur enzymatischen Umwandlung einer Farbstoff-Vorstufe in die farbige Verbindung benutzt wird, zeigt Glucose an.

Die glycosidische Bindung

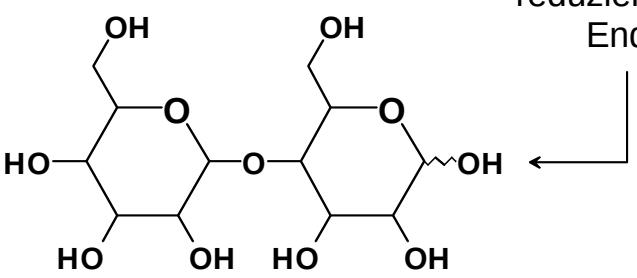
Monosaccharide können mit Alkoholen Vollacetale, sogenannte Glycoside, bilden. Glycosidasen, Kohlenhydrat-hydrolysierende Enzyme, spalten die (Voll-)Acetal-Bindung in Glycosiden wieder unter Wasser-Freisetzung auf:



Ist bei der Vollacetalbildung der Reaktionspartner ebenfalls ein Monosaccharid, entstehen Disaccharide. Man unterscheidet zwei Typen von Disacchariden.

a) Der Maltose-Typ:

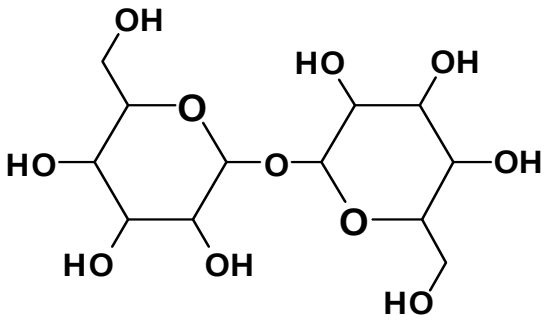
Die Acetalisierung erfolgt zwischen der **Halbacetalgruppe** des einen und einer **alkoholischen** OH-Gruppe des zweiten Monosaccharids. Bestimmend für die chemischen Reaktionen der Vertreter dieser Reihe ist die Tatsache, dass das zweite Monosaccharid noch seine Halbacetalgruppierung



enthält. Diese zeigt natürlich dasselbe Verhalten wie in den Monosacchariden. Disaccharide vom Maltose-Typ zeigen also Mutarotation, d.h. es sind α- und β-Formen isolierbar. Weiterhin ist die Endiolisierung in alkalischer Lösung möglich. Daraus folgt, dass die Reduktionsproben, z.B. die Trommer'sche Probe, positiv sind.
Beispiele: Maltose, Laktose.

b) Trehalose-Typ:

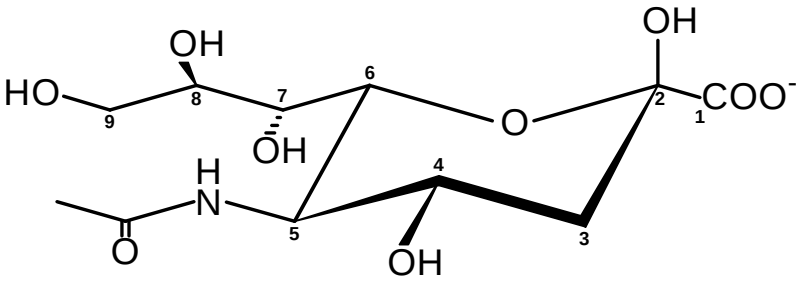
Die Acetalisierung erfolgt zwischen der **Halbacetalgruppe** des einen und dem **halbacetalischen** Hydroxyl des zweiten Monosaccharids. Die verbleibenden Hydroxylgruppen dieses Disaccharid-Typs sind alle alkoholisch, daher bleiben chemische Reaktionen, die an die Halbacetalgruppe gebunden sind, aus. Disaccharide vom Trehalose-Typ zeigen keine Mutarotation und Reduktionsproben sind negativ.



Beispiele: Trehalose, Saccharose.

Glycoproteine, Glycolipide, Mucoide

Die Kohlenhydratanteile dieser konjugierten Verbindungen sind meist Oligosaccharide geringer Kettenlänge (2-15 Glieder bei Glycoproteinen, 4-7 bei Glycolipiden, 2-4 bei Mucoiden). Sie enthalten neben Glucose, Galactose und Mannose auch *N*-Acetylhexosamine und L-Fucose (eine 6-Desoxyhexose). Als typischer Bestandteil besonders der Ganglioside, vieler Glycoproteine und Antigene (Blutgruppensubstanzen!) tritt außerdem die *N*-Acetylneuraminsäure, das am weitesten verbreitete Mitglied der Familie der Sialinsäuren (Abkürzung Neu5Ac od. früher NANA) auf. Ihr liegt eine Amino-desoxyketulosonsäure mit 9 C-Atomen zugrunde:



N-Acetylneuraminsäure
(MW: 309,28)

Die meisten Proteine enthalten geringfügige Kohlenhydratanteile. Echte Glycoproteine (>3% Gewichtsanteil der Kohlenhydrate) sind u.a. alle Serumproteine außer Albumin sowie manche Hypophysenhormone. Das Kohlenhydrat-reichste Serumprotein ist das saure α_1-Glycoprotein („Orosomucoid“) des Serums (MW: 44 kDa), das sich teilweise bereits wie ein Mucoid (Schleimstoff) verhält; es ist z.B. nicht, wie fast alle übrigen Proteine, durch Trichloressigsäure fällbar.

Um das Verhältnis von Kohlenhydrat zu Protein messen zu können, muss neben der Bestimmung der Kohlenhydrate auch der Gehalt an Protein in der zu untersuchende Lösung bestimmt werden.

Die Glycolyse

Die Glycolyse ist der Hauptabbauweg der Glucose in fast allen Organismen. Unter aeroben Bedingungen wird ihr Endprodukt, das Pyruvat, über den Citratcyclus und die Atmungskette weiter verbrannt (siehe unten). In Zellen höherer Organismen, in denen nur begrenzt Sauerstoff verfügbar ist (z.B. im intensiv arbeitenden Muskel),

wird Pyruvat zu Lactat reduziert. Das Enzym Lactatdehydrogenase ist im Cytosol aller Zellen lokalisiert und kommt in Form von verschiedenen Isoenzymen vor.

Isoenzyme

Viele Enzyme des Zellstoffwechsels existieren in multiplen Formen, die zwar die gleiche Reaktion katalysieren, sich aber in Primär-, Sekundär-, Tertiär- und/oder Quartärstruktur sowie in ihrer Kinetik und eventuell in ihrer Affinität für Regulatoren unterscheiden. Man nennt diese Formen Isoenzyme. Sie können durch übliche Proteintrennungsmethoden voneinander getrennt werden. Isoenzyme sind u.a. bekannt von der Hexokinase, der Pyruvatkinase, der Creatinkinase und der Lactatdehydrogenase.

Die LDH-Isoenzyme des Menschen (Molekulargewicht ca. 140 kDa) bestehen aus 4 etwa gleich großen Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von je ca. 35 kDa. Diese Untereinheiten werden durch nicht-kovalente Bindungen zusammengehalten. Sie lassen sich daher z.B. durch Harnstoffzusatz, extreme pH-Verschiebung oder Veränderung der Ionenstärke von einander trennen. Die Untereinheiten sind jedoch nicht völlig gleichartig, sondern gehören entweder einem H-(Herz) oder einem M-Typ (Muskel) an. Die beiden Typen unterscheiden sich durch ihre Aminosäurezusammensetzung und die elektrophoretische Beweglichkeit. Die Kombination dieser beiden Monomeren zu einem Tetrameren ergibt die 5 LDH-Isoenzyme:

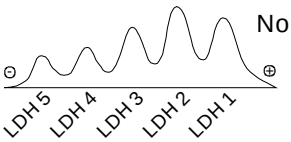
Isoenzym	Untereinheiten	
LDH-1	HHHH	migriert bei pH=8,6 am schnellsten zur Anode
LDH-2	HHHM	
LDH-3	HHMM	
LDH-4	HMMM	
LDH-5	MMMM	migriert bei pH=8,6 am langsamsten zur Anode

Die verschiedenen Isoenzyme sprechen unterschiedlich auf allosterische Effektoren (z.B. Pyruvat) an. Ihr Verteilungsmuster in den verschiedenen Organen weist eine Korrelation zu deren O_2-Versorgung auf. Gut versorgte Organe, wie das Herz und

das Gehirn, enthalten hauptsächlich LDH-1 und LDH-2, man spricht daher vom „H-Typ“, während Gewebe, die einen überwiegend anaeroben Stoffwechsel aufweisen, wie die Skelettmuskeln oder maligne Tumoren, aber auch die Leber, in erster Linie LDH-4 und LDH-5, den „M-Typ“ enthalten.

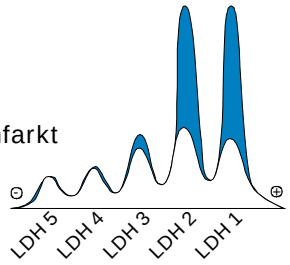
Beim Herzinfarkt, Leber- und Blutkrankheiten sowie malignen Tumoren gelangt LDH aus dem Zytoplasma geschädigter Zellen ins Serum. Die Bestimmung der LDH-Isoenzyme im Serum ist daher zu einer wertvollen Hilfe für die Diagnose und die Verlaufskontrolle dieser Krankheiten geworden. Die im Serum messbare LDH-Aktivität stellt eine Summe der aus verschiedenen Organen stammenden Isoenzyme dar. Man kann daher aus einer einfachen Aktivitätsbestimmung nicht unbedingt Rückschlüsse auf die Organherkunft der Enzyme ziehen. Da aber das Verhältnis der einzelnen Isoenzyme von Organ zu Organ verschieden ist, spiegelt sich die Schädigung eines bestimmten Gewebes auch als typisches Isoenzym-Muster im Serum wieder. Im klinischen Labor wird häufig auf die aufwendige Elektrophorese der LDH-Isoenzyme verzichtet. Man nutzt die Tatsache, dass ein Substratanaloges des Lactats, das α-Hydroxybutyrat, von LDH-1 (und etwas geringer von LDH-2) besser umgesetzt wird als von LDH-5. Je kleiner der Quotient **L**actat-**D**e**h**ydrogenase-Aktivität/ α -**H**ydroxy**b**utyrat-**D**e**h**ydrogenase-Aktivität (LDH/HBDH-Quotient), desto größer ist der Anteil der aus dem Herzmuskel stammenden Isoenzyme.

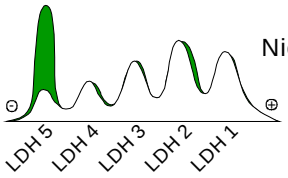
LDH-Isoenzym-Elektrophorese



Normalserum

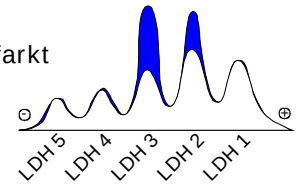
Myokardinfarkt

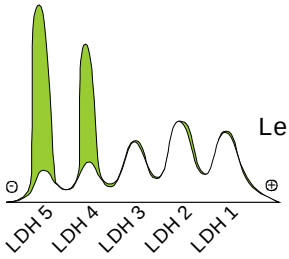




Nierenerkrankung

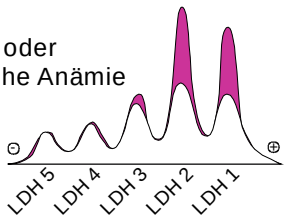
Lungeninfarkt

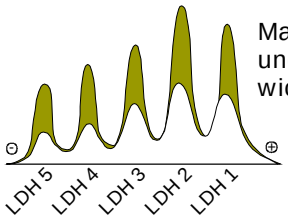




Lebererkrankung

Perniziöse oder hämolytische Anämie





Maligne Neoplasten und Schock mit Nekrose wichtiger Organe

Citratcyclus

Hauptort der Energiegewinnung einer Zelle sind die Mitochondrien. In ihnen laufen der Citratcyklus und die Atmungskette ab. Der Citratcyklus ist eine cyklische Kette von enzymkatalysierten Reaktionen. Er dient einmal als Endstrecke für den Abbau aller Nahrungsstoffe. Dabei wird aus diesen CO_2 gebildet und die für den Energiegewinn in der Atmungskette benötigten reduzierten (wasserstoffbeladenen) Coenzyme ($NADH+H^+$, $FADH_2$, u.a.) bereitgestellt. Im Citratcyklus kann auch das bei der aeroben Glycolyse aus Glucose gebildete Acetyl-CoA abgebaut werden. Weiterhin stellen die Metaboliten des Citratcyklus ein Sammelbecken („pool“) für Zwischenprodukte des Stoffwechsels, z.B. des Aminosäurestoffwechsels, dar. Ein wichtiger Energie liefernder Schritt im Citratcyklus ist die Oxidation von Succinat zu Fumarat, wobei $FADH_2$ gebildet wird (Aufgabe 4).

Die Atmungskette dient der Oxidation der reduzierten Co-Substrate $NADH+H^+$ und $FADH_2$ des Stoffwechsels unter Bildung von ATP als Energieträger. Sie ist die wichtigste Energie Lieferantin im Organismus. Über eine Reihenfolge von Redoxsystemen (=organischen Verbindungen, deren Oxidations- und Reduktionszustand unterschiedliche Energieinhalte haben) wird der Wasserstoff der reduzierten Co-Substrate unter Bildung von Wasser auf Sauerstoff übertragen und die Energie der Wasserbildung durch die oxidative Phosphorylierung in Form von ATP abgeschöpft. Die Atmungskette besteht aus Flavoproteinen, Hilfssubstraten (Ubichinon) und Cytochromen, die sich in ihren Redoxbereichen, d.h. in den Energiedifferenzen zwischen ihrem oxidierten und ihrem reduzierten Zustand, gegenseitig überlagern und somit ineinandergreifend eine geschlossene Elektronentransportkette darstellen.

Die Cytochrome sind Eisenporphyrin-Proteine, in denen, im Unterschied zu Hämoglobin und Peroxidasen, das Eisen während des Redoxvorganges einem Valenzwechsel unterliegt. Die Oxidationszustände können durch eine allosterische Änderung der Proteinkonformation stabil erhalten werden.

Lipide

Zu den Lipiden gehören die unveresterten (freien) **Fettsäuren, die Triglyzeride (=Triacylglyzerine), Phospholipide und Cholesterin** (frei und verestert). Als weitere Gruppe sind **Glykolipide** zu nennen (Sphingolipide und Ganglioside). **Triglyzeride** liefern mit drei an das Glyzerin gebundenen Fettsäuren in der ß-Oxidation Energie. Ein besonders hoher Bedarf an Fettsäuren zur Energiegewinnung hat der Muskel. Als Energiereserve dienen die im Fettgewebe gespeicherten Fettsäuren. **Phospholipide** sind primär wichtig für die Membranstruktur aller Zellen. Sie sind aber auch wichtig bei der Signalübertragung (IP3) sowie in Sphingolipiden und Gangliosiden. **Cholesterin** ist Strukturbestandteil der Zellmembranen und Ausgangssubstanz für Steroidhormone, Vitamin D und Gallensäuren. Die einzige Möglichkeit des Körpers Cholesterin auszuscheiden ist die Umwandlung in Gallensäuren in der Leber.

Lipoproteinstoffwechsel

Im Lipidstoffwechsel spielen die Lipoproteine eine große Rolle. Die Nahrungslipide werden im Darm mit Gallensäuren in Mizellen verpackt und durch die Pankreaslipase hydrolysiert. Die Enterozyten nehmen die Lipide aus den Mizellen auf und bauen sie in Chylomikronen ein. Diese triglyzeridreichen Lipoproteine werden über die Lymphe ins Blut transportiert und dort von der endothelständigen Lipoprotein Lipase (LPL) hydrolysiert. Für die Lipaseaktivität ist das Apoprotein C-II als Cofaktor notwendig, welches an die Lipoproteine gebunden vorkommt. Die dabei entstehenden freien Fettsäuren werden in Muskelzellen und Fettzellen aufgenommen.

Kohlenhydrataufnahme

Mit der Nahrung nehmen wir vor allem Polysaccharide auf, Stärke aus Gemüse und Getreide, Saccharose aus Obst und Glykogen aus Fleisch. Mit Vollkornprodukten und Gemüse nehmen wir neben Stärke auch Cellulose auf, die zu den, in unserer Ernährung wichtigen Ballaststoffen zählt. Die Aufnahme von Mono- und Disacchariden, den süßen Kohlenhydraten, ist vor allem durch zuckerhaltige Getränke in den letzten Jahren gestiegen. Wir sollten etwa 50-60% der Energie in

Form von Kohlenhydraten aufnehmen; davon sollte der überwiegende Teil aus komplexen Kohlenhydraten und weniger als 20% aus Zucker bestehen.
Alle Polysaccharide der Nahrung müssen in Monosaccharide, bevorzugt in Glucose umgewandelt werden um im Energiestoffwechsel relevant zu sein. Die Verdauung der Stärke und des Glykogen beginnt so schon im Speichel durch die □-Amylase. Die dabei entstehenden Oligosaccharide und die Disaccharide aus der Nahrung werden durch verschiedenen Enzyme im Bürstensaum der Mucosazellen zu Monosacchariden gespalten. Diese werden dann durch die in der Membran der Mucosazellen lokalisierten Transportsysteme aufgenommen. Es gibt verschiedene Systeme für die unterschiedlichen Monosaccharide. Am besten charakterisiert ist der natriumabhängige Glucosetransporter, der Hexosen aus dem Darmlumen in die Mucosazellen transportiert, solange durch die ATP-abhängige Natrium-Kalium-Pumpe der intrazelluläre Natriumspiegel niedrig gehalten wird. Die Darmzellen geben die Glucose dann durch ein weiteres Transportersystem an das Blut ab.

Regulation der Blutglucose

Nach einer kohlenhydratreichen Mahlzeit steigt der Blutglucosewert an. Zur Erhaltung der Glucose-Homöostase (Abb.1) ist es wichtig, dass die erhöhten Glucosekonzentrationen erkannt werden und eine entsprechende Regulation einsetzt. Die Blutglucose-Konzentration liegt normaler Weise im nüchternen Zustand zwischen **80 und 100 mg/dl** (das entspricht 4,4 - 6,6 mmol/l). Eine zu niedrige Konzentration führt zum Ausfall Glucose-abhängiger Zellen, wie z.B. den Erythrozyten oder Neuronen. Zu hohe Konzentrationen führen zu den im Diabetes mellitus bekannten Spätschäden an den Gefäßwänden. Die Regulation der Blutglucose erfolgt primär über das Peptidhormon Insulin, das in den beta-Zellen der Langerhans-Inseln des Pankreas synthetisiert wird. Die beta-Zellen des Pankreas sind auch Sensor für die Blutglucosekonzentration (Abb. 2). Beim Ansteigen der Glucosekonzentration wird die Glucose über Glucosetransporter (GLUT2) in die beta-Zellen aufgenommen und dann über die Glykolyse, den Citratcyclus und die Atmungskette verstoffwechselt. Das dabei vermehrt entstehende ATP hemmt einen K^+-Kanal und die Plasmamembran depolarisiert. Diese Depolarisation führt zur Öffnung von spannungsabhängigen Ca^{2+}-Kanälen, so dass Ca^{2+}-Ionen ins Cytosol einströmen können, die dann zur Exozytose der Insulin-enthaltenden Granula führen (Abb. 2).

Abb. 1: Regulation der Blutglucose-Konzentration (Löffler, Petrides: Biochemie und Pathobiochemie)

Synthese und Wirkung von Insulin

Das Insulin wird als Präpro-Insulin an den Ribosomen synthetisiert und durch die Signalsequenz ins ER eingeschleust. Dort wird das Präpro-Insulin posttranslational durch Proteolyse zum Proinsulin prozessiert und im letzten Schritt das C-Peptid herausgeschnitten, wobei das fertige Insulin entsteht. Dieses wird in den exozytotischen ß-Granula der beta-Zellen gespeichert. Die postprandiale Glucoseerhöhung im Blut führt dann zur Freisetzung des Insulins (siehe oben). Welche Aufgabe erfüllt nun das Insulin? Es ist ein endokrin wirkendes Hormon, d.h. es wird vom Syntheseort (Pankreas) durch das Blut zu den Erfolgsorganen transportiert. Die wichtigsten Erfolgsorgane sind die Muskulatur und das Fettgewebe. In diesen Geweben stimuliert das Insulin die Aufnahme von Glucose aus dem Blut.

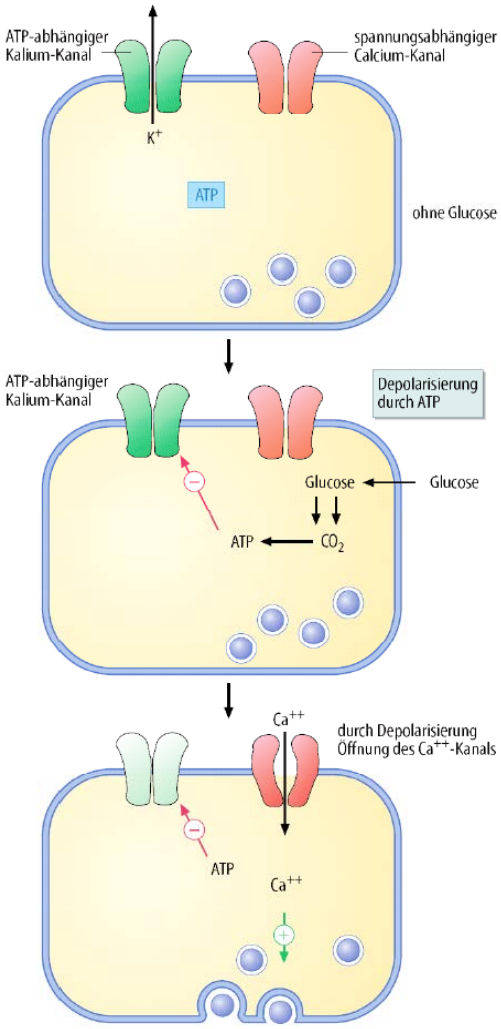


Abb. 2: Die beta-Zelle des Pankreas als Biosensor für die Blutglucose-Konzentration

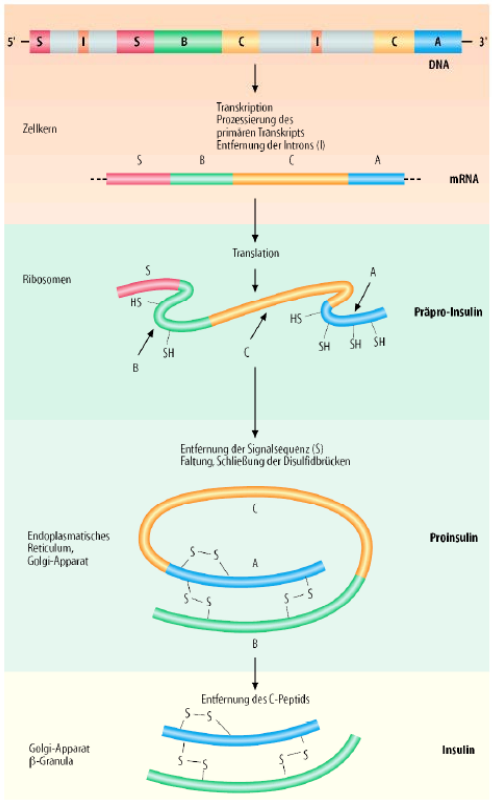


Abb. 3: Biosynthese Prozessierung des Insulins

Die Insulinwirkung erfolgt über den Insulinrezeptor, der in der Plasmamembran der Zellen verankert ist (Abb.5). Der Insulinrezeptor gehört zur Klasse der Wachstumsfaktor- Rezeptoren. Er besteht aus 2 α- und 2 ß-Ketten, die über Disulfidbrücken verbunden sind. Die extrazellulären Domänen tragen die Insulin-Bindungsstelle und die intrazellulären Domänen die Tyrosinkinase-Aktivität. Die Bindung von Insulin führt zu einer Konformationsänderung, die in der Aktivierung der Tyrosinkinase resultiert, was zur gegenseitigen Phosphorylierung der ß-Ketten führt. Diese Strukturveränderung des Insulinrezeptors erlaubt dann die Bindung von intrazellulären Proteinen an den Rezeptor. Das wichtigste ist dabei das Insulin-Rezeptor-Substrat (IRS), welches durch den Insulinrezeptor an seinen Tyrosinresten

phosphoryliert wird und in dieser aktivierten Form weitere Signalmoleküle binden kann. Es gibt dann zwei wichtige Signalwege: (1) die Verknüpfung mit dem Adaptorprotein GRB2 zum MAP-Kinase-Signalweg, der mitogene Signale vermittelt (Wachstumsförderung) und (2) die Aktivierung der Phosphatidylinositol-3 (PI3)-Kinase, die u.a. zur Aktivierung der Proteinkinase B (PKB) führt und dadurch zur Translokation des Glucosetransporter 4 (GLUT-4) und zur Steigerung der Glykolyse und der Glykogensynthese (Abb.4).

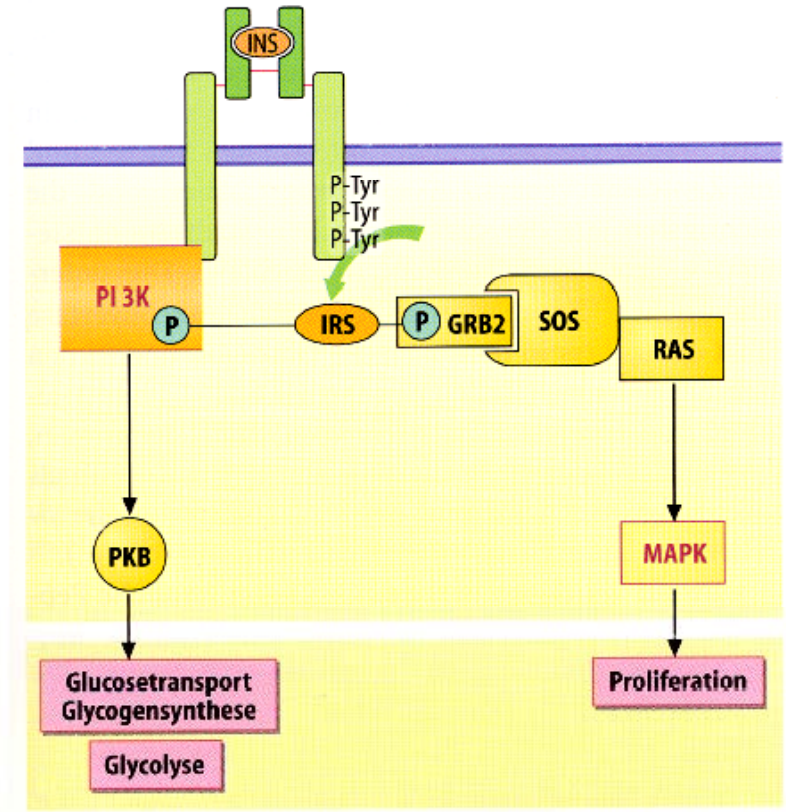


Abb. 4: Signalwege des Insulinrezeptors

Die GLUT-4 sind ohne Insulin in Membranvesikeln in der Zelle lokalisiert und werden durch die Insulinstimulation in die Membran transportiert um die Glucose aufnehmen zu können. Die Glykogensynthese wird über die Phosphorylierung der Glykogensynthasekinase 3 (GSK3) und die Glykolyse über die Phosphofruktokinase-2 (PFK2) beeinflusst. Das heißt über den Insulinrezeptor-Signalweg wird die Glucoseaufnahme im Fettgewebe und in den Muskelzellen gesteigert und damit die Plasmakonzentration gesenkt. In der Zelle wird die Glucose dann je nach Bedarf in den verschiedenen Geweben entweder als Glykogen gespeichert oder über die Glykolyse abgebaut und zur Energiegewinnung genutzt. Fällt die

Glucosekonzentration, wird kein Insulin mehr gebildet und bei dem Unterschreiten der physiologischen Untergrenze von 4,4 mmol/l werden die Gegenspieler Glucagon, die Katecholamine und Glukocorticoide aktiv.

Gestörter Glucosestoffwechsel im Diabetes mellitus

In der Bundesrepublik Deutschland leben über 3 Millionen Diabetiker, von denen 1 Million nichts von ihrer Krankheit wissen. Das ist besonders unter dem Gesichtspunkt, dass schlecht eingestellter Diabetes die Lebenserwartung deutlich reduziert, erschreckend. Die Krankheitsbilder des Diabetes mellitus Typ 1 (Juveniler Diabetes) und Diabetes mellitus Typ 2 (Altersdiabetes) sind mit Defekten bei der Bildung oder Wirkung des Insulins verknüpft. Abhängig von der Art und der Schwere des Diabetes ist bereits der Nüchternblutzucker deutlich erhöht (>130 mg/dl). Das Vorliegen eines Typ 2 Diabetes kann bei normaler Nüchternglucose durch den oralen Glucose-Toleranztest (OGTT) diagnostiziert werden. Eine Glukosurie tritt erst bei einer Hyperglykämie mit Werten über 10 mmol/l (180 mg/dl) auf.

Oraler Glucose-Toleranztest (OGTT)

Diese in der Klinik häufig durchgeführte Methode zur Früherkennung des Diabetes ist wichtig, da bei einem latenten Diabetes der ‚Nüchtern-Blutzucker' noch normal (< 100 mg/dl) sein kann. In dem OGTT werden 75 g Glucose (ca. 1g/kg Körpergewicht) in Form eines Getränkes gegeben und die Glucosekonzentration nach 30 und 60 min gemessen. Die Plasmakonzentration steigt dadurch auf das 1,6-1,8-fache an und sollte nach 3 Stunden wieder auf dem Ausgangswert sein. Durch eine überschießende Insulinsekretion kann es zu einer Unterschreitung des Ausgangswertes kommen (posthyperglykämische Hypoglykämie). Bei erhöhten Nüchternzuckerwerten (>130 mg/dl) sollte kein OGTT durchgeführt werden, sondern zur weiteren Diagnostik die Insulinwerte oder andere Stoffwechselparameter gemessen werden. Dies ist der Fall beim Typ 1 Diabetes, bei dem die Pankreaszellen kein Insulin synthetisieren und es bereits im Kindesalter zu sehr hohen Glucosewerten im Nüchternplasma kommt. Die Bewertungskriterien des OGTT nach der ‚European Association for the Study of Diabetes' (EASD) sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Die charakteristischen Verläufe des OGTT bei einem gesunden Probanden und einem Patienten mit einer gestörten Glucosetoleranz sind in Abb.5 dargestellt. Beim Typ 2 Diabetes liegt als Ursache in der Regel eine gestörte Insulinsensitivität vor, d.h. es wird vor allem in der frühen Phase der Erkrankung ausreichend Insulin produziert, das Insulin kann jedoch auf zellulärer Ebene nicht richtig wirken. Diese ‚Insulinresistenz' wird über längere Zeit durch eine gesteigerte Insulinproduktion (Hyperinsulinämie) ausgeglichen und es kommt in dieser Phase klinisch noch nicht zu einem erkennbaren Typ 2 Diabetes. Erst wenn es zu einer ‚Ermüdung' der Pankreaszellen kommt, kann die reduzierte Insulinwirkung nicht mehr ausgeglichen werden und es tritt eine Glucoseerhöhung auf und ein Diabetes mellitus Typ 2. Um die Entstehung des Diabetes zu verhindern, ist es sehr wichtig, die Insulinresistenz frühzeitig mit dem OGTT zu erkennen. Die wichtigsten, einfach erkennbaren Risikofaktoren für die Entwicklung einer Insulinresistenz sind Übergewicht und das Auftreten von Typ 2 Diabetes in der Familie (genetische Prädisposition). In diesen Fällen und beim Vorliegen eines Nüchternglucosewertes zwischen 100 und 130 mg/dl sollte unbedingt ein OGTT durchgeführt werden.

(Alle Angaben in mg/100 ml)	Nüchternwert	30-, 60-, 90-Minutenwert	120-Minutenwert	180-Minutenwert
Normalbereich	< 100	160	120	100
Grenzbereich	100 - 130	160 - 220	120 - 150	100 - 130
Patholog. Bereich	> 130	220	150	130

Tabelle 1: Blutglucose im Serum nach Belastung mit 75 g Glucose oral

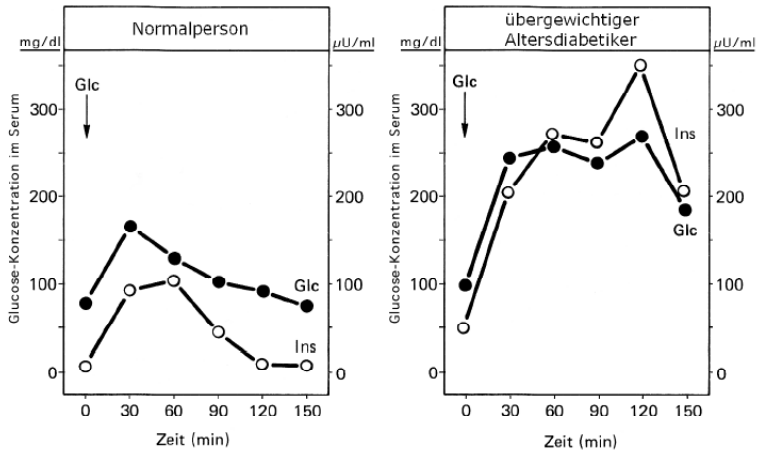


Abb. 5: Zeitliche Änderung der Konzentration von Glucose und Insulin im Glucose-Toleranz-Test beim Diabetes mellitus Typ 2 im Vergleich zum Gesunden.

Aufgabe 1: Chemische und enzymatische Hydrolyse von Stärke

Polysaccharide können durch saure Hydrolyse oder durch Hydrolasen gespalten werden.

Benötigte Lösungen:

Stärkelösung	1 g Stärke ad 100 ml Aqua bidest.
Kupfersulfat-Lösung	4 g $CuSO_4$ ad 100 ml Aqua bidest.
Natronlauge	10 g NaOH ad 100 ml Aqua bidest.
verdünnte HCl	2 M HCl
Jod-Lösung **(nach Lugol)**	10 mg Jod in 10 ml einer 12 mM Kaliumjodid-Lösung gelöst
Speichel	Praktikantenspucke

Durchführung: Achtung! Glasröhrchen verwenden!

Versuch a): Säurehydrolyse der Stärke

1. 1 ml der Stärkelösung wird in einem Reagenzglas mit 2 ml der verdünnten Salzsäure vermischt und 2 Minuten über dem Bunsenbrenner zum Kochen erhitzt.
2. Nach dem Erhitzen wird das Reagenzglas 5 Minuten auf Raumtemperatur abgekühlt.
3. Als **Kontrolle** werden 1 ml Stärkelösung mit 1 ml Aqua bidest. Gemischt und jeweils 1ml für die Jod-Stärkereaktion und die Trommer'sche Probe bereitgehalten.

Je 1 ml der Hydrolysemischung und der Kontrolle werden für die **Jod-Stärkereaktion** herangezogen und je 1 ml für die **Reduktionsprobe nach Trommer** verwendet.

4. Für die **Jod-Stärkereaktion** werden die Proben mit 50 µl Jod-Jodkaliumlösung versetzt und durchmischt.

5. Für die **Trommer´sche Probe** werden 1 ml Probelösung in einem Reagenzglas (**kein Kunstoff-Röhrchen!**) mit 0,5 ml Natronlauge und 20 µl Kupfersulfat-Lösung versetzt und anschließend über der Flamme erhitzt.
   Tragen Sie eine Schutzbrille und halten Sie die Röhrchenöffnung nicht auf sich oder andere.

Bei Gegenwart reduzierender Substanzen entsteht eine Gelb- bis Rotfärbung.

Versuch b) Spaltung von Stärke mit Speichelamylase (Ptyalin)

1. Zwei Reagenzgläser werden mit ungefähr je 500 µl Speichel von der gleichen Person versehen. Die eine Speichelprobe wird nun ca. 1 Minute über dem Bunsenbrenner erhitzt und anschließend abgekühlt (Kontrolle).
2. Zwei Kunststoff-Röhrchen werden mit je 500 µl Stärkelösung beschickt und werden auf je 10 ml mit Aqua bidest. verdünnt.
3. Die verdünnte Stärkelösung des einen Röhrchens wird zum nicht erhitzten Speichel gegeben, die andere zum erhitzten Speichel.
4. Nach Durchmischen der Proben werden die Reagenzgläser 10 Minuten bei 37°C inkubiert und danach abgekühlt.
5. Für die **Jod-Stärkereaktion** werden je 1 ml der Proben mit 50 µl Jod-Jodkaliumlösung versetzt und durchmischt.
6. Für die **Trommer´sche Probe** wird je 1ml Probelösung in einem Reagenzglas (**kein Kunststoff-Röhrchen!**) mit 0,5 ml Natronlauge und 20 µl Kupfersulfat-Lösung versetzt und anschließend über der Flamme erhitzt.
   Tragen Sie eine Schutzbrille und halten Sie die Röhrchenöffnung nicht auf sich oder andere.

Bei Gegenwart reduzierender Substanzen entsteht eine Gelb- bis Rotfärbung.

Aufgabe 2: Nachweis der Blutgruppendeterminanten des AB0-Systems mit Glycosidasen

Von jedem Tisch ist dieser Versuch nur einmal durchzuführen. Es soll bestimmt werden, welche Stoffe für die Blutgruppenaktivität verantwortlich sind und in welcher Konformation sie vorliegen.

Benötigte Lösungen:

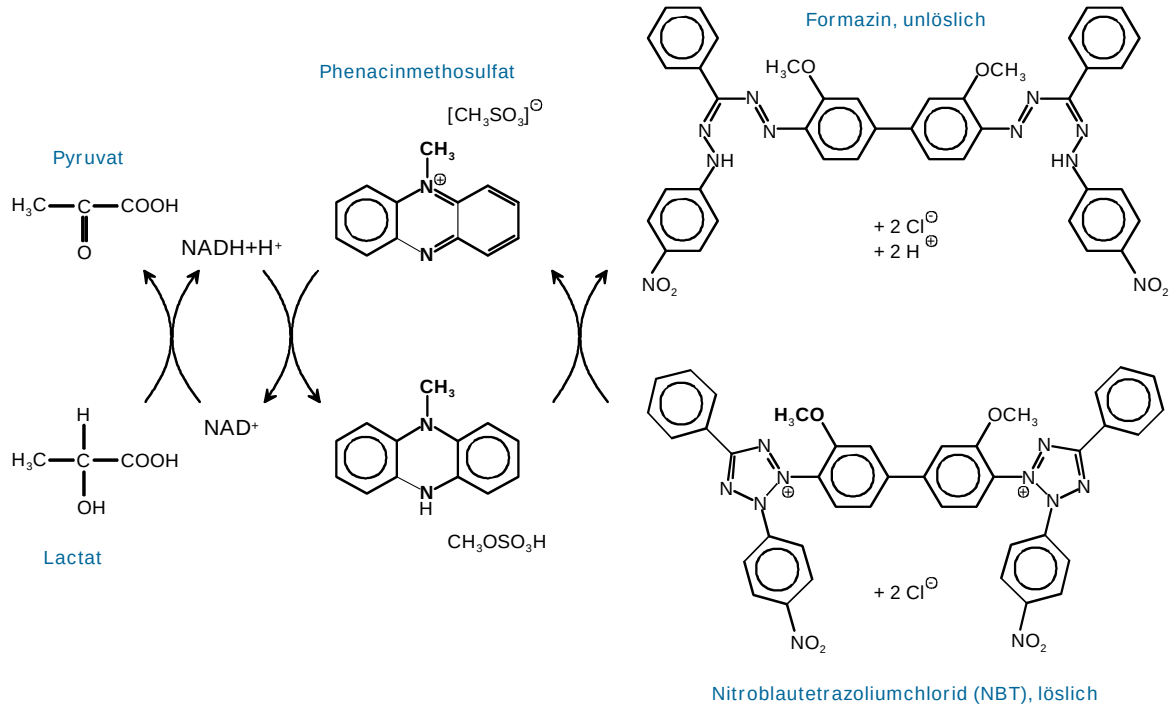
Blut der Blutgruppe B ohne Enzym	10 µl Vollblut der Blutgruppe B + 10 µl Maleatpuffer, pH 6,5
Blut der Blutgruppe B mit Enzym	10 µl Vollblut der Blutgruppe B + 10 µl α-Galactosidase in Maleatpuffer, pH 6,5
Antiserum Anti-B	

Durchführung:

1. Je 10 µl Vollblut der Blutgruppe B wurden mit 10 µl Maleatpuffer (Kontrolle) bzw. 10 µl α-Galactosidase in Maleatpuffer In Eppendorf-Reagenzgefäßen gemischt. Diese fertigen Proben können Sie in der Materialausgabe abholen.
2. Die beiden Gefäße werden 120 Minuten bei 37°C in einem Eppendorf-Inkubationsblock inkubiert.
3. Nach Beendigung der Inkubation werden je 20 µl des Enzymansatzes und der Kontrolle getrennt auf einen sauberen Glas-Objektträger getropft.
4. Je 20 µl Antiserum Anti-B werden dazu gegeben und mit einem Rührspatel gemischt.

Aufgabe 3: Trennung der Isoenzyme von Lactatdehydrogenase (LDH) durch Elektrophorese

Die von der LDH katalysierte Reaktion dient dazu, die LDH-Isoenzyme auf den Celluloseacetatstreifen nach der Elektrophorese sichtbar zu machen. Da das gebildete $NADH+H^+$ unsichtbar ist, wird es durch eine Farbreaktion angezeigt. Der an $NADH+H^+$ gebundene Wasserstoff wird mit dem Katalysator Phenazinmethosulfat auf die organische Base Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (die Formel ist kein Prüfungsstoff) übertragen und dadurch zu einem schwerlöslichen, violetten Farbstoff reduziert:



Bei der elektrophoretischen Trennung der Serumproteine erhält man auf dem Träger fünf Bereiche mit Lactatdehydrogenase-Aktivität. Es müssen also 5 Enzyme mit unterschiedlicher elektrophoretischer Beweglichkeit vorliegen.

Durchführung:

Elektrophorese

Zur elektrophoretischen Trennung benutzen wir im wesentlichen die gleiche Technik wie im Praktikum I.

1. Der weiße Celluloseacetat-Streifen wird an einer Ecke mit einem **Kugelschreiber** mit dem Namen versehen und 5 cm von einem Streifenende entfernt markiert man am Rand vorsichtig die Startlinie mit einem Kugelschreiber. Danach wird der Streifen an einem Ende erfasst und mit dem freien Ende voran vorsichtig auf die Pufferlösung gelegt, wobei keinesfalls Luftblasen zwischen dem Streifen und dem Puffer bleiben dürfen.
2. Nach mindestens 10 Minuten ist der Streifen ausreichend mit Puffer vollgesogen. Er wird dann mit Hilfe der Pinzetten kurz zwischen zwei Filterpapieren von überschüssigem Puffer befreit und danach über die äußeren Falze der Elektrophoresekammer gespannt (siehe Praktikum I, Figur 3). Fixiert werden die Streifen rechts und links durch zwei kleine Magnete. Die Folienenden müssen unbedingt in die Pufferlösung in beiden Teilkammern eintauchen!
3. Die Elektrophoresekammer wird nach Einlegen des Streifens bis zum Auftragen des Serums durch den Deckel der Kammer geschlossen gehalten, um ein Austrocknen des Celluloseacetat-Streifens zu vermeiden.
4. Sobald alle Arbeitsgruppen eines Tisches ihre Streifen in die Elektrophoresekammer gebracht haben, werden die Serumproben **unmittelbar nacheinander** auf jeden Streifen aufgetragen. Hierzu wird eine Auftragsbrücke über den Streifen gesetzt, so dass die Farbmarkierungen an der Brücke mit denen an der Elektrophoresekammer übereinstimmen. Die Aussparung am schwarz markierten Ende der Auftragsbrücke muss in den Falz einrasten.
5. Zum Auftragen der Probe wird ein Auftragsstempel benutzt. Bei Druck auf dessen Taste bis zum Anschlag ragt an seiner Unterseite eine Öse heraus. Deren Unterseite wird mit der jeweiligen Serumprobe ausreichend benetzt, indem sie horizontal über die Oberfläche eines Serumtropfens gestreift wird. Der Ösensteg darf nicht in das Serum eintauchen!
6. Folgende Serumproben werden zur Verfügung auf die entsprechende Bahnen aufgetragen:

   Bahn 1 - Normalserum

   Bahn 2 - pathologisches Serum

   Bahn 3 - Vergleichspräparat (LDH-Isoenzyme vom Schwein).

7. Nach dem Benetzen soll die Taste langsam in die Ausgangsstellung zurückgleiten. Der Auftragsstempel wird mit der vorderen Nut in das mit 1 gekennzeichnete Loch der Auftragsbrücke gesetzt, danach die Taste erneut gedrückt, so dass das an der Öse haftende Serum auf den Celluloseacetat-Streifen übertragen wird. Je Probe wird dieser Vorgang dreimal wiederholt.
8. Sofort danach wird die Öse (**nur diese!**) mit Aqua bidest. gespült und mit Filterpapier trockengetupft.
9. Nach Beendigung des Auftragens wird die Elektrophoresekammer mit dem Deckel so verschlossen, dass seine Markierung mit der der Elektrophoresekammer übereinstimmt.
10. Die Zuleitungen werden an die gekennzeichneten Gleichstrombuchsen am Arbeitsplatz angeschlossen (rot = Anode; schwarz = Kathode). **Es fließt dann ein Strom mit 250 V Spannung.**
11. Ca. 60 Minuten nach Anlegen der Gleichspannung wird der Strom unterbrochen und wie nachfolgend beschrieben gefärbt.

Nachweis der LDH-Isoenzyme (wird vom Praktikums-Laboranten durchgeführt)

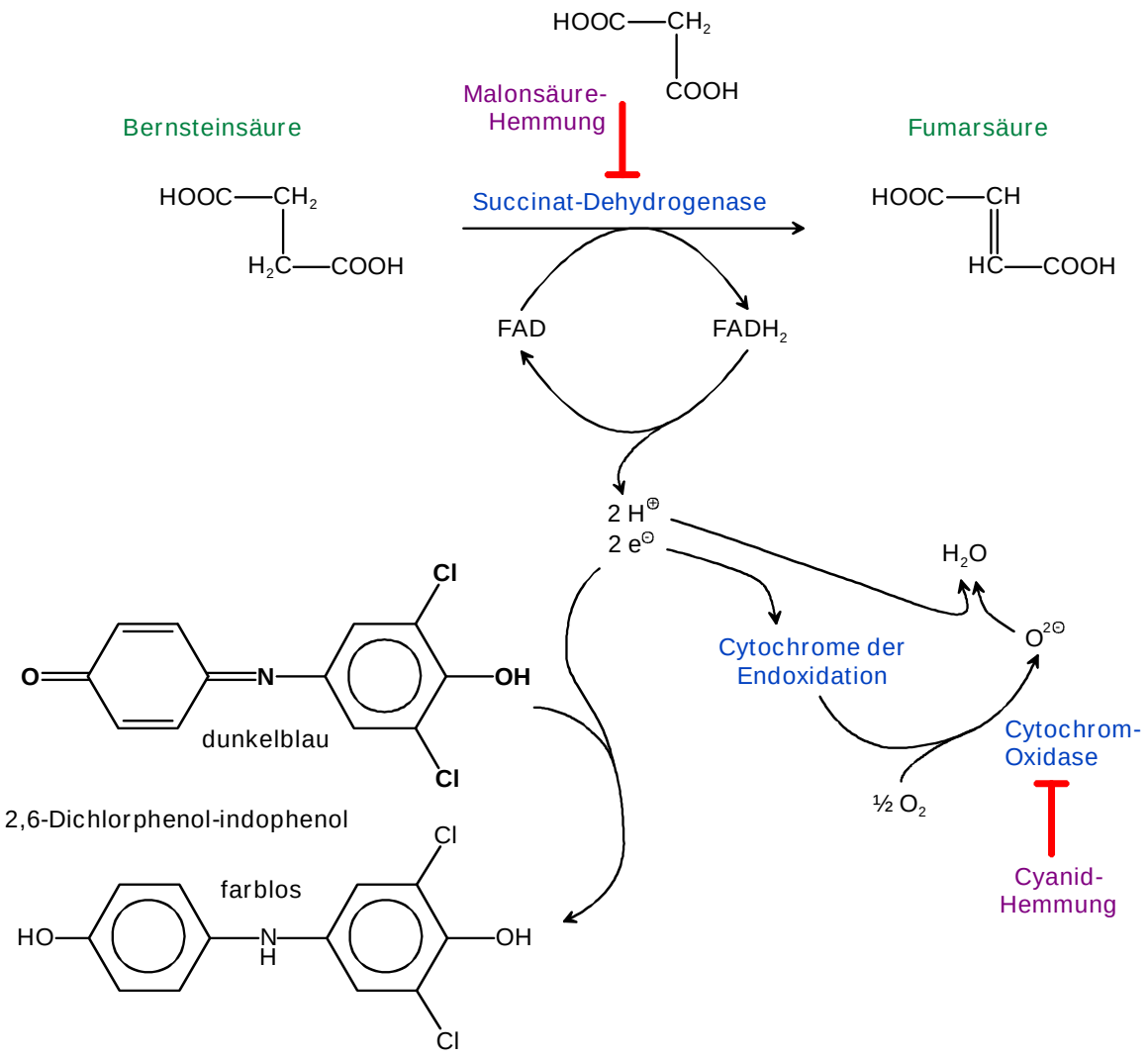
Die Streifen werden nach unten folgendem Rezept entwickelt:

1. Das Färbereagenz, bestehend aus Tris-Puffer mit Lactat, $NADH+H^+$, Phenazinmethosulfat und Nitroblau-Tetrazoliumchlorid, wird auf ein Uhrglas gegossen.
2. Eine unbenutzte Acetatfolie wird mit der Reaktionsmischung getränkt. Nach Abtropfen des überschüssigen Reagenzes wird die Folie in eine Aluminium-Schale gelegt.
3. Nun wird der Elektrophorese-Streifen (Puffer abtropfen lassen!) mit der Auftragsseite so auf die Reagenzfolie gelegt, dass keine Luftblasen zwischen den Streifen eingeschlossen werden. Dann wird die Schale sofort mit einer Glasplatte verschlossen, an deren Unterseite sich feuchtes Filterpapier befindet. An dieser Stelle wird Ihnen die Schale für die weitere Inkubation zurückgegeben.
4. Die zugedeckte Schale wird nun für 30 Minuten bei 37°C im Brutschrank inkubiert.
5. Anschließend wird der gefärbte Celluloseacetatstreifen für 10 Minuten in das Fixierbad gelegt.

Aufgabe 4: Qualitativer Nachweis der Succinat-Dehydrogenase-Aktivität in Rattenlebermitochondrien

Die Succinat-Dehydrogenase, ein mitochondriales Flavin-Enzym, katalysiert die Dehydrierung von Succinat (Bernsteinsäure) zu Fumarat (Fumarsäure). Die Elektronen werden auf das Cytochromsystem der Atmungskette übertragen. Es ist jedoch auch möglich, im Modellversuch den Elektronentransport über das Cytochromsystem mit Kaliumcyanid zu hemmen und als Ersatz den Farbstoff 2,6-Dichlorphenol-indophenol (DCPIP) als Wasserstoff- und Elektronen-Akzeptor anzubieten.

Durch Elektronenaufnahme (Reduktion) entfärbt sich der dunkelblaue Farbstoff und geht in seine farblose Form über. Die Dehydrierung von Succinat zu Fumarat durch die Succinat-Dehydrogenase wird durch Malonat (Malonsäure) kompetitiv gehemmt. Die Strukturformeln von Malonat und Succinat zeigen die chemische Ähnlichkeit:



Benötigte Lösungen:

Puffer	0,1 M	Tris-HCl, pH 7,4
Succinat-Lösung	0,3 M	Succinat in Tris-Puffer
Malonat-Lösung	0,03 M	Malonat in Tris-Puffer
DCPIP-Lösung	2 mM	2,6-Dichlorphenol-indophenol in Tris-Puffer
KCN-Lösung	60 mM	Kaliumcyanid in Tris-Puffer
Lebermitochondrien	5g/ml	Rattenleber-Mitochondrien in Tris-Puffer

Durchführung:

1. 6 Kunststoff-Röhrchen werden entsprechend den Angaben in der Tabelle beschickt:

Ansatz	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**
Succinat	1,0 ml	1,0 ml	1,0 ml	1,0 ml	3,0 ml	-
Malonat	-	-	-	1,0 ml	1,0 ml	-
DCPIP	1,0 ml	1,0 ml	1,0 ml	1,0 ml	1,0 ml	1,0 ml
KCN	0,1 ml	0,1 ml	-	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
Puffer	3,0 ml	4,0 ml	3,0 ml	2,0 ml	-	4,0 ml
Mitochondrien	1,0 ml	-	1,0 ml	1,0 ml	1,0 ml	1,0 ml

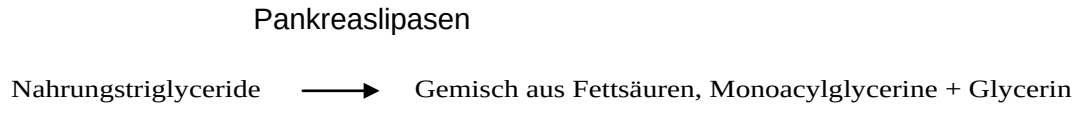
2. Durch die Zugabe der Rattenleber-Mitochondrien wird die Reaktion gestartet. Der Inhalt der Röhrchen muss gut durchmischt werden.
3. Die Röhrchen werden für 30 Minuten in einem 37°C-Wasserbad inkubiert.
4. In Abständen von 1-2 Minuten wird die Änderung der Farbintensitäten in den Ansätzen abgeschätzt.

Aufgabe 5: Aktivierung der Pankreaslipase durch Gallensäuren

Grundlagen

Pankreaslipasen werden in den Acinuszellen des Pankreas synthetisiert und sezerniert. Diese Enzyme spalten Nahrungstriglyceride langkettiger Fettsäuren (Palmitin-, Stearin-, Ölsäure). Als Reaktionsprodukte entstehen freie Fettsäuren und Di- bzw. Monoglyceride. Pankreaslipase unterscheidet sich von unspezifischen triglyceridspaltenden Esterasen dadurch, dass sie zum Einem ihre Wirkung spezifisch an der Grenzfläche vom Emulsionen langkettiger Triglyceride entfaltet und zum Anderem dass sie durch Gallensäuren aktiviert wird. Lipasen, die Triglyceride langkettiger Fettsäuren spalten, kommen außer im Pankreas (relative Aktivität 100%) auch in einer Reihe von Organen, jedoch in wesentlich geringerer Aktivität vor (Niere 0,9%, Herzmuskel 0,28%, Leber 0,8%).

Gallensäuren spielen während des enzymatischen Abbaus der Nahrungslipide eine zentrale Rolle. Sie besitzen eine polare und unpolare Molekülregion und sind effektive biogene Detergenzien, die in der Lage sind, durch Bildung von Mizellen Nahrungslipide zu solubilisieren und damit ihre Oberfläche und ihre Angreifbarkeit für Verdauungsenzyme zu vergrößern. Mit den durch enzymatischen Aufschluß der Nahrungslipide entstandenen Abbauprodukten (Fettsäuren, Cholesterin, lipidlösliche Vitamine u.a.) bilden die Gallensäuren wasserlösliche Komplexe, die von den Mucosazellen der Darmschleimhaut resorbiert werden können. Ein zweiter unabhängiger Effekt ist die Fähigkeit der Gallensäuren zur Aktivierung der Pankreaslipase und der Cholesterinesterase.



Medizinische Bedeutung

Die klinische Diagnose von Pankreaserkrankungen ist wegen der besonderen Lage, Struktur und Funktion der Bauchspeicheldrüse schwierig. Die Lipase gilt als empfindlicher und spezifischer diagnostischer Parameter für Pankreaserkrankungen. Die Bestimmung der Lipaseaktivität im Serum kann entscheidend zur Diagnostik der akuten Pankreatitis ("akutes Abdomen") und der chronischen Pankreatitis beitragen. Bei akuter Schädigung des Pankreas treten die sonst nach Nahrungsaufnahme in den Darm abgegebenen Enzyme infolge der Zellschädigungen vermehrt in das Blut über. Bei der chronischen Pankreatitis kommt es im allgemeinen nur bei einem Entzündungsschub oder bei mechanischer Abflußbehinderung zum Anstieg der Lipase im Serum. In manchen Fällen von chronischem Alkoholismus oder bei Erkrankungen der Gallenwege kommt es zur Mitbeteiligung des Pankreas und Anstieg der Lipaseaktivität im Serum.

Ein Mangel an Gallensäuren im Intestinaltrakt, der z.B. durch Abflußstörungen von Gallenflüssigkeit bedingt sein kann, führt zu mangelhaftem enzymatischen Abbau der Nahrungstriglyceride mit den Folgen einer Steatorrhoe (Fettstuhl), da die Pankreaslipase ohne Gallensäuren nicht in der Lage ist, die Nahrungstriglyceride abzubauen. Diese passieren dann unverdaut den Darmtrakt.

Versuchsprinzip

Zur Bestimmung der Pankreaslipase-Aktivität wird die Abnahme der Trübung (Lichstreuung!) einer verdünnten Emulsion von Glycerin-tri-ölsäureester (Triolein) unter Wirkung der Lipase photometrisch bestimmt. Dies wird einmal in Abwesenheit und einmal in Gegenwart von Gallensäuren durchgeführt.

Versuchsdurchführung

Die Substratmischungen (6) und (7) werden kurz vor Beginn des Versuchs für jeweils mindestens 30 s auf einem Magnetrührer gerührt. Die Messungen mit den Ansätzen A und B werden parallel durchgeführt.

Pipettieren Sie zunächst Wasser sowie die Substratmischungen ohne bzw. mit Desoxycholat in drei entsprechend beschriftete Reagenzgläser (Volumen in ml). Kalibrieren Sie Ihr Photometer bei einer Wellenlänge von 450 nm gegen Wasser (Referenz). Messen Sie dann die Extinktionen der Substratmischungen vor Zugabe der Lipase. Starten Sie die Reaktion durch Zugabe der Lipase-Colipase-Lösung (sorgfältig mischen, aber nicht schütteln!) und verfolgen Sie die Extinktionsentwicklung bei 37°C in den beiden Ansätzen A und B. Dazu lesen Sie die Extinktion beider Ansätze über einen Zeitraum von 15 min alle 60 s ab.

Reagenzien (Angabe in ml)	**Referenz**	**Ansatz A (mit Desoxycholat)**	**Ansatz B (ohne Desoxycholat)**
Wasser	1,00	-	-
Substratmischung (6) mit Triolein (ohne Desoxycholat)	-	-	1,00
Substratmischung (7) mit Triolein (mit Desoxycholat)	-	1,00	-
Lipase (1000 U) (5)	-	0,04	0,04
+			
Colipase (50 μg/ml)	-	0,08	0,08

Reagenzien

(1) Triolein-Lösung (1% in absolutem Ethanol)

(2) Tris-Calciumcarbonat-Puffer pH 9,15 (51,4 mM Tris, 0,064 mM Calciumcarbonat)

(3) 8,06 mM Desoxycholat in Puffer (2)

(4) Rinderserumalbumin-Lösung, 0,05% in Wasser (BSA)

(5) Pankreaslipase (Sigma) + Colipase (Sigma), mit Rinderserumalbumin (4) auf geeignete Aktivität verdünnt

(6) Substratmischung: zu 25 ml Puffer (2) pipettiert man unter rotierender Bewegung tropfenweise 1 ml Triolein-Lösung (1)

(7) Substratmischung mit Gallensäuren (GC): Zusatz von 1 ml Triolein-Lösung (1) wie unter (6), jedoch unter Verwendung von Puffer (3)

Die Reagenzien wird vorbereitet gestellt.

Auswertung

Als Maß für die Aktivität der Lipase wird die Geschwindigkeit der Extinktionsabnahme (durch verminderte Streuung an den Tröpfchen der Emulsion) während der Inkubation gewählt. Die Anlagerung der Lipase an die Lipidtröpfchen verläuft in Abwesenheit von Desoxycholat erheblich langsamer. Daher beobachtet man am Beginn der Inkubation in Ansatz B zunächst eine konstante oder sogar leicht ansteigende Extinktion. Die gemessenen Extinktionen von Ansatz A, E(A), bzw. Ansatz B, E(B), werden gegen die Zeit aufgetragen und die Steigungen für den linear abfallenden Teil der Kurven (in Ansatz B erst nach Erreichen der Phase konstanter Reaktionsgeschwindigkeit) ermittelt. Das Verhältnis der Lipaseaktivität in Gegenwart und Abwesenheit von Gallensäuren (Desoxycholat) ergibt sich aus dem Quotienten der Steigungen von Kurve A und Kurve B.

Aufgabe 6: Bestimmung von Glucose und Insulin vor und nach oraler Glucose-Belastung

Versuch A: Glucose-Belastungstest

Jeweils 1 (nüchterner) Student einer Gruppe wird mit Glucose belastet und unterzieht sich einem verkürzten Test, bei dem 3 Blutentnahmen mit Teststreifen ausgewertet werden. In diesem Teil des Praktikums wollen wir die Glucose-Messung so vornehmen, wie sie viele Diabetes-Patienten selbst durchführen, nämlich mit Teststreifen. Auch hier wird die hohe Spezifität von Enzymen zur Erfassung der Glucose direkt im Blut ausgenutzt. Das Messfeld enthält entsprechende Enzyme und Substrat, dessen Verfärbung durch ein spezielles Photometer quantifiziert werden kann. Eine Kalibrierung mit einer Eichkurve ist nicht notwendig, da die standardisierte Produktion der Teststreifen eine ausreichende Genauigkeit gewährleistet. Die Handhabung der Geräte ist auf der nächsten Seite beschrieben. Sofort nach Praktikumsbeginn entnimmt und analysiert der den Selbstversuch durchführende Student die erste Blutprobe mit einem Teststreifen; anschließend trinkt er die ausgegebene Glucose-Lösung. Die Menge der einzunehmenden Glucose wird individualisiert; die Vorgabe ist:

45 g Glucose pro m^2 Körperoberfläche

Die Körperoberfläche wählt man häufig als maßgebliche physiologische Bezugsgröße, z.B. bei der Dosierung von Arzneimitteln oder bei Stoffwechsel- und Clearance-Untersuchungen. Sie berechnet sich annähernd nach der Dubois-Formel:

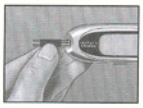
$$\text{Körperoberfläche } [m^2] = \text{Gewicht}^{0,425} * \text{Größe}^{0,725} * 0,0071\ [m^2/kg*cm]$$

Berechnen Sie **vor dem Praktikum**, wieviel ml der ausstehenden 28%-igen Glucose-Lösung Sie für den Belastungstest aus dem Vorratsgefäß "zapfen" müssen. Notieren Sie die Uhrzeit der Einnahme! Für die späteren Blutproben (nach 30, 60 und 90 min) sind die Zeiten zu beachten.

Messvorgang starten S. 7

Teststreifen einlegen

Vor dem Einlegen des Teststreifens den Code auf dem Teststreifenröhrchen überprüfen. Achten Sie darauf, dass die drei Kontaktstreifen zu Ihnen zeigen. Drücken Sie den Streifen soweit wie möglich hinein. Der Teststreifen darf sich nicht biegen.



Das Messgerät schaltet sich ein, es wird eine Startanzeige und dann eine Codenummer angezeigt. Bei der ersten Verwendung des Messgeräts erscheint im Anzeigefeld "––" anstelle einer Nummer.

Den auf dem Messgerät angezeigten Code mit dem Code auf dem Teststreifenröhrchen vergleichen

Wenn der Code auf dem Messgerät nicht mit dem Code auf dem Teststreifenröhrchen übereinstimmt, drücken Sie auf ▲ bzw. ▼, um die Codenummer zu ändern. Wenn auf dem Anzeigefeld das blinkende Blutstropfensymbol erscheint, bevor Sie bereit sind, ziehen Sie den Teststreifen heraus und starten Sie den Messvorgang von vorne.

Das Messgerät ist für die Messung bereit, wenn das blinkende Blutstropfensymbol erscheint.

Blutprobe gewinnen S. 10

Das OneTouch® Lanzettengerät vorbereiten

Entfernen Sie die blaue Kappe und setzen Sie eine neue Lanzette in das Lanzettengerät ein. Drehen Sie die Schutzkappe ab. Setzen die Kappe wieder auf und spannen Sie das Lanzettengerät.

Blutstropfen gewinnen

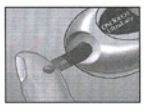
Halten Sie die Kappe des OneTouch® Lanzettengeräts fest gegen Ihren Finger. Drücken Sie dann den Auslöser.

Drücken bzw. massieren Sie die Fingerbeere sanft, bis sich ein runder Blutstropfen von mindestens einem Mikroliter (● tatsächliche Größe) gebildet hat.

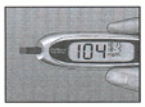
Blut auftragen und Messergebnisse ablesen S. 22

Halten Sie den Blutstropfen an den schmalen Kanal an der oberen Kante des Teststreifens, so dass er ihn berührt.

Das Blut wird in den Teststreifen eingesogen. Halten Sie den Blutstropfen weiter an die obere Kante des Teststreifens, bis das Bestätigungsfenster vollständig gefüllt ist.



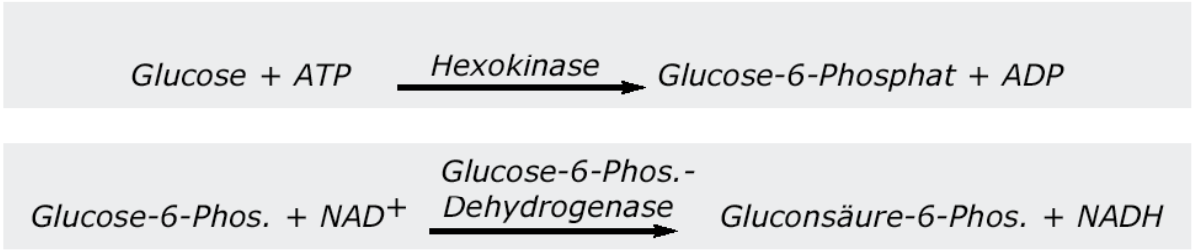
Das Messgerät beginnt von fünf bis eins rückwärts zu zählen. Dann wird Ihr Blutzuckerspiegel zusammen mit der Maßeinheit sowie dem Datum und der Uhrzeit der Messung angezeigt.



Wenn das Messergebnis niedriger, höher oder nicht wie erwartet ausfällt, lesen Sie bitte die Informationen auf Seite 24-25.

Versuch B: Glucose-Bestimmung der vorbereiteten Proben

Jede Gruppe erhält 6 Seren eines fiktiven Probanden, die vor und zu verschiedenen Zeitpunkten nach oraler Glucose-Belastung gewonnen wurden. Es gilt die Zeitverläufe der Glucose- sowie der Insulin-Spiegel zu analysieren, um herauszufinden, ob es sich um eine gesunde Person oder einen Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 handelt. Dabei sollen Sie die Glucose enzymatisch in einem klassischen "feucht-biochemischen" Test im Reagenzglas bestimmen. Die Analyse der Insulin-Spiegel würde ein immunologisches Verfahren (ELISA) erfordern, das wir aus Zeitmangel im Praktikum nicht durchführen können; es werden Ihnen deshalb typische Meßwerte eines solchen Tests ausgegeben, mit welchen Sie "trocken" eine Auswertung vornehmen sollen.
Bei der Bestimmung der Glucose in biologischen Flüssigkeiten (d.h. in Anwesenheit vieler ähnlicher Verbindungen) wird die hohe Spezifität der Enzyme Hexokinase und Glucose-6-phosphatdehydrogenase genutzt, die eine selektive Oxidation der Glucose bewirken. Die Absorption des bei der Reaktion in stöchiometrischen Mengen entstehenden NADH wird bei 334 nm gemessen. Folgende Gleichungen beschreiben den Reaktionsablauf (Sie entsprechen übrigens den ersten Reaktionen des Pentosephosphat-Wegs):



Der Vergleich mit gleichzeitig gemessenen Glucose-Lösungen bekannter Konzentrationen (Eichkurve) gestattet die Berechnung der Glucose-Konzentrationen in den Versuchsansätzen. Die Ergebnisse sollten in der zeitgemäßen Einheit "mmol/l" angegeben werden; da aber in der Klinik noch immer die frühere Einheit "mg/dl" gebräuchlich ist und auch das hier verwendete Teststreifen-Photometer die Ergebnisse in "mg/dl" ausgibt, werden wir den Praktikumsversuch ebenfalls auf Grundlage dieser Einheit auswerten. Sie sollen aber in der Lage sein, Glucose-

Konzentrationen von einer in die andere Einheit umzurechnen (Molekulargewicht von Glucose: 180 g/mol).
Es werden insgesamt 18 Reaktionsansätze gemessen: 6 Glucose-Standards sowie 12 Patientenproben (6 Zeitpunkte in Doppelbestimmung). Es werden also 18 Plastik-Zentrifugen-Röhrchen entsprechend von 1A bis 18A durchnummeriert. Für die photometrische Bestimmung müssen alle Proben 1:10 verdünnt werden. Von dieser Verdünnung werden je 100 µl in neue Röhrchen pipettiert.
Nachdem nun alle Röhrchen (1B bis 18B) mit 100 µl Glucose-Standard bzw. 100 µl Probe beschickt worden sind, werden der Reihe nach 900 µl Reaktionsgemisch dazugegeben und sofort gründlich durchmischt. Die Ansätze bleiben 15 min bei Raumtemperatur bis zur photometrischen Auswertung stehen. Diese wird bei 365 nm am Eppendorf-Photometer gegen Luft durchgeführt (d.h. die Nullstellung des Gerätes erfolgt ohne Küvette). Die Extinktionswerte werden auf der (logarithmischen) Skala abgelesen und in Tabelle 2 eingetragen. Zunächst wird die Glucose-Eichkurve konstruiert (Ansätze 1B bis 6B). Berechnen Sie dazu die Glucose-Konzentrationen in den jeweiligen Testansätzen. Sie lassen sich aus der oben angegebenen Glucose-Konzentration der verwendeten Standard-Lösung errechnen.

Zeichnen Sie dann die Eichgerade (Y-Achse: Extinktion, X-Achse: Konzentration) und ermitteln mit ihrer Hilfe die Glucose-Konzentrationen in den Ansätzen Nr. 7B bis 18B. Das kann durch optisches Ablesen an der Eichgeraden geschehen oder - eleganter - durch Errechnen nach der Formel:

$$\text{Glucose-Konz.} = \frac{\text{Probenextinktion } \textit{minus} \text{ y-Achsenabschnitt (= Leerwert)}}{\text{Steigung der Eichgerade}}$$

Die so erhaltenen Glucose-Konzentrationen in den Testansätzen müssen Sie dann Umrechnen in die Glucose-Konzentrationen im Patientenserum. In einem zweiten Diagramm tragen Sie diese Serum-Glucose-Werte gegen die Entnahmezeit (Abszisse) auf. Verwenden Sie dabei alle Werte (keine Mittelwerte bilden) und zeichnen Sie einen nach Ihren Meßwerten wahrscheinlichen Kurvenverlauf. Ebenfalls

in dieses Diagramm werden die entsprechenden Werte aus der Insulin-Bestimmung eingetragen (s. dort).
Vergleichen Sie die Ergebnisse mit den Glucose-Ausscheidungskurven, die von Ihnen und von anderen Gruppen für fiktive Patienten erstellt wurden. Beurteilen Sie, ob der Selbstversuch den Normalfall eines Gesunden wiedergibt.

Aufgabe

Um welchen Faktor auf molarer Ebene ist eine Insulin-Konzentration von 50 µU/ml niedriger als eine Glucose-Konzentration von 100 mg/dl (mögliche Normalwerte zwischen den Mahlzeiten)? Berechnen Sie dazu die molaren Konzentrationen beider Stoffe. (1 Internationale Einheit Insulin ist definiert als 1 U = 25 mg; Molekulargewichte: Insulin 5800 g/mol, Glucose 180 g/mol).

Tabelle 1: Vorbereitung der Patientenproben (Röhrchen 7A-18A)

	Röhrchen 1A-18A je
Wasser	500 µl
Patientenprobe/Glucose Standard	50 µl
	→ Mischen → 100µl klarer Überstand für die Röhrchen B

Tabelle 2: Pipettierschema für den Glucosestandard und den Patientenproben

Nr.	**Probe**	**Vol [µl]**	**H_2O [µl]**	**Reaktions-gemisch [µl]**	**Extinktion [365]**	**Glucose-Konz. im Testansatz [mg/dl]**	**Glucose-Konz. [mg/dl]**
1	Leerwert	-	100	900			
2	Glucose-Standard (1:10 Verdünnung) 40 mg/dl	10	90	900			
3		25	75	900			
4		50	50	900			
5		75	25	900			
6		100	-	900			

Patient Nr:_____

Nr.	Probe	Vol [µl]	H_2O [µl]	Reaktions-gemisch [µl]	Extinktion [365]	Glucose-Konz im Testansatz [mg/dl]	Glucose-Konz im Serum [mg/dl]
7	Probe vor Glucose-einnahme	100	-	900			
8		100	-	900			
9	Probe nach 30min	100	-	900			
10		100	-	900			
11	Probe nach 60min	100	-	900			
12		100	-	900			
13	Probe nach 90min	100	-	900			
14		100	-	900			
15	Probe nach 120min	100	-	900			
16		100	-	900			
17	Probe nach 150min	100	-	900			
18		100	-	900			

Der häufigste Messfehler entsteht durch unsaubere optische Flächen der Küvette. Daher bitte beim Ausgießen der Küvette auf Sauberkeit achten.

Versuch C: Insulin-Bestimmung: Auswertung gegebener ELISA-Daten

Die Serumkonzentrationen von Hormonen sind um mehrere Größenordnungen niedriger als die von Stoffwechselprodukten wie Glucose. Die Quantifizierung von derart niedrigen Konzentrationen erfordert besondere Messmethoden. In der medizinischen Diagnostik haben sich dazu immunologische Verfahren etabliert; dabei nutzt man die hohe Spezifität und vor allem Affinität von Antikörpern für das Erfassen der Zielmoleküle (hier Insulin) aus. Sowohl in der Forschung wie auch in

der Routine-Diagnostik des Klinischen Labors werden für Messungen besonders von Hormonen und Tumor-Markern ELISA-Teste durchgeführt. ELISA steht für “enzyme linked immunosorbent assay”. Dabei macht man sich die folgenden
Aspekte zunutze:

- ➔ Die Hybridoma-Technologie ermöglicht die unbegrenzte Produktion von Antikörpern, die sich auf die spezifische Erkennung und Bindung praktisch aller zu messenden Makromoleküle abrichten lassen.
- ➔ Die Reaktionen lassen sich in kleinen Volumina in sogenannten Mikrotiterplatten aus Polystyrol mit 96 Vertiefungen (Kavitäten, engl. wells) durchführen und sind so weitgehend automatisierbar.
- ➔ Proteine lassen sich unter Erhalt ihrer biologischen Funktion stabil an die Polystyrol-Oberfläche adsorbieren.
- ➔ Kovalente Komplexe aus Antikörpern und bestimmten Enzymen (Konjugate) lassen sich unter Erhalt ihrer biologischen Funktionen herstellen: Antikörperbindungsfähigkeit bzw. Enzymaktivität.

Diese Werkzeuge ermöglichen unterschiedliche Testaufbauten, von denen die beiden häufigsten der Sandwich-ELISA und der Kompetitions-ELISA sind. Der Praktikumsversuch, den wir hier aus Zeitgründen nicht durchführen können, aber mit repräsentativen Werten auswerten wollen, basiert auf einem Kompetitions-ELISA. Hierbei werden neben den Patientenproben einige Vertiefungen zur Eichung mit definierten Insulinmengen befüllt. Die Messwerte für Ihren fiktiven Patienten (*wegen besserer Übersichtlichkeit Extinktion x 1000; also z.B. 345 statt 0,345*) erhalten Sie eingetragen auf einem besonderen Blatt, auf welchem Sie auch die berechneten Insulin-Werte notieren. Die Auswertung können Sie an der von Ihnen gezeichneten Eichkurve vornehmen. Tragen Sie dann die Insulin-Konzentrationen zusammen mit den oben bestimmten Glucose-Konzentrationen in das Zeit-Diagramm ein.
Diskutieren Sie den zeitlichen Verlauf der Glucose- und Insulin-Konzentrationen bei Ihrem "Patienten” und versuchen Sie eine Diagnose zu stellen: Für welchen der folgenden Fälle sprechen die experimentellen Befunde?

Praktische Aufgaben 1 bis 6

Praktikumsgruppe:

Namen der Praktikanten

Aufgabe 1:

Beobachtungen:

		hydrolysiert	nicht hydrolysiert
Versuch 1 a	Jod		
	Trommer		

		nicht erhitzter Speichel	erhitzter Speichel
Versuch 1 b	Jod		
	Trommer		

Diskussion der Ergebnisse:

.....

.....

.....

.....

.....

Aufgabe 2:

Ansatz	**+ Enzym**	**- Enzym**
Agglutination		

Geben Sie die Struktur der B-determinanten Gruppe an und erläutern Sie die Wirkungsweise der α-Galactosidase darauf.

.....

.....

Was müssten Sie tun, um ausgehend von Blut der Blutgruppe A das gleiche Ergebnis zu bekommen?

.....

Diskussion der Ergebnisse:

.....

.....

.....

Aufgabe 3:

Zeichnen Sie die Lage und Intensität der angefärbten Banden ab und versuchen Sie anhand der Angaben im Abschnitt Isoenzyme der Einleitung (siehe Seite 8) festzustellen, aus welchen Organen die LDH-Isoenzyme in den benutzten Seren vermutlich stammen.

.....

.....

.....

.....

.....

Aufgabe 4:

Ordnen Sie die folgenden Versuchbeobachtungen Ihren entsprechenden Ansätzen zu:

☐ Es ist kein Substrat für die Succinat-Dehydrogenase zugegeben worden. Eine Abnahme der Farbintensität des DCPIP ist auf endogenes Succinat aus den Mitochondrien oder auf unspezifische Reaktionen zurückzuführen.

☐ Die Enzymreaktion wird durch Malonat gehemmt.

☐ Die Farbintensität nimmt nur langsam ab, weil der normale Weg des Elektronentransportes über die Cytochromoxidase nicht durch KCN gehemmt worden ist.

☐ Es läuft keine Enzymreaktion ab, weil keine Mitochondrien zugegeben worden sind. Dieser Ansatz dient als Bezugswert; er zeigt die ursprüngliche Farbintensität des DCPIP.

☐ DCPIP wird durch die Enzymreaktion reduziert, die Farbintensität nimmt daher am schnellsten ab.

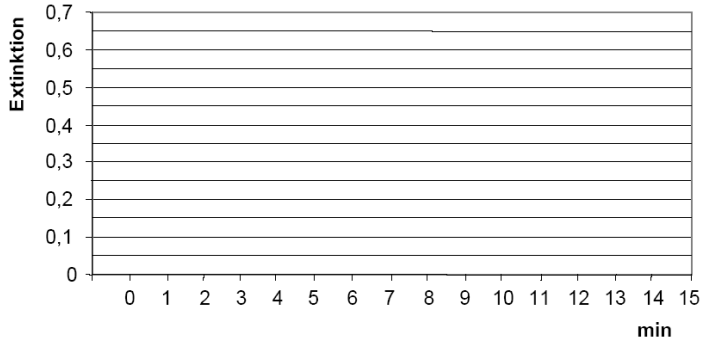
☐ Die kompetitive Malonat-Hemmung wird durch eine höhere Succinat-Konzentration aufgehoben bzw. vermindert.

Diskussion der Ergebnisse:

.....
.....
.....
.....
.....

Aufgabe 5:

Tragen Sie die abgelesenen Extinktionswerte (450nm) für die Ansätze A (mit Desoxycholat) und B (ohne Desoxycholat) im Diagramm ein und ermitteln Sie die Kurvenverläufe für beide Ansätze.
Ermitteln Sie die jeweilige Steigung des linear abfallenden Teils der Kurve A und B. Beschreiben und diskutieren Sie Unterschiede in der Lipaseaktivität in den beiden Ansätzen.



.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....

Aufgabe 6:

Versuch A: Glucose-Belastungstest

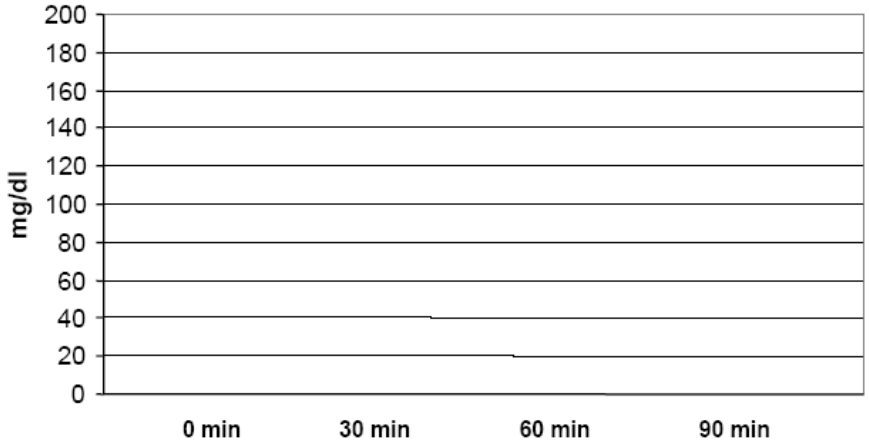
Ermittelte Körperoberfläche des Studierenden:.....

Menge an zu sich zunehmender Glucose (g):.....

Menge (ml) an zu trinkender 28%iger Glucoselösung:.....

	0 min	30 min	60 min	90 min
mg/dl				
mmol/l				

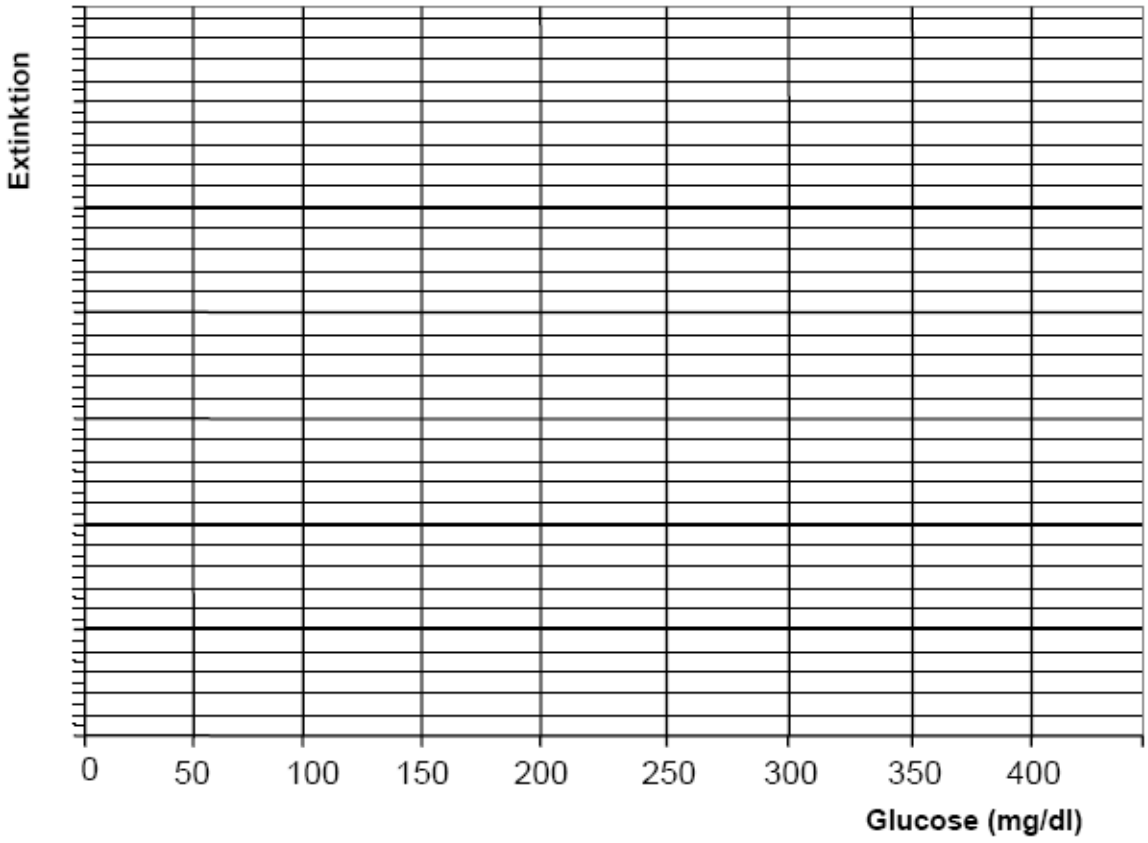
Tragen Sie die Messwerte ins Diagramm ein und diskutieren Sie die Glucosetoleranz.



.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....

Versuch B:

Diagramm zur Erstellung der Glucose-Standardgeraden. Tragen Sie die abgelesenen Extinktionswerte der berechneten Glucosestandards (Ansätzen 1-6) ein.

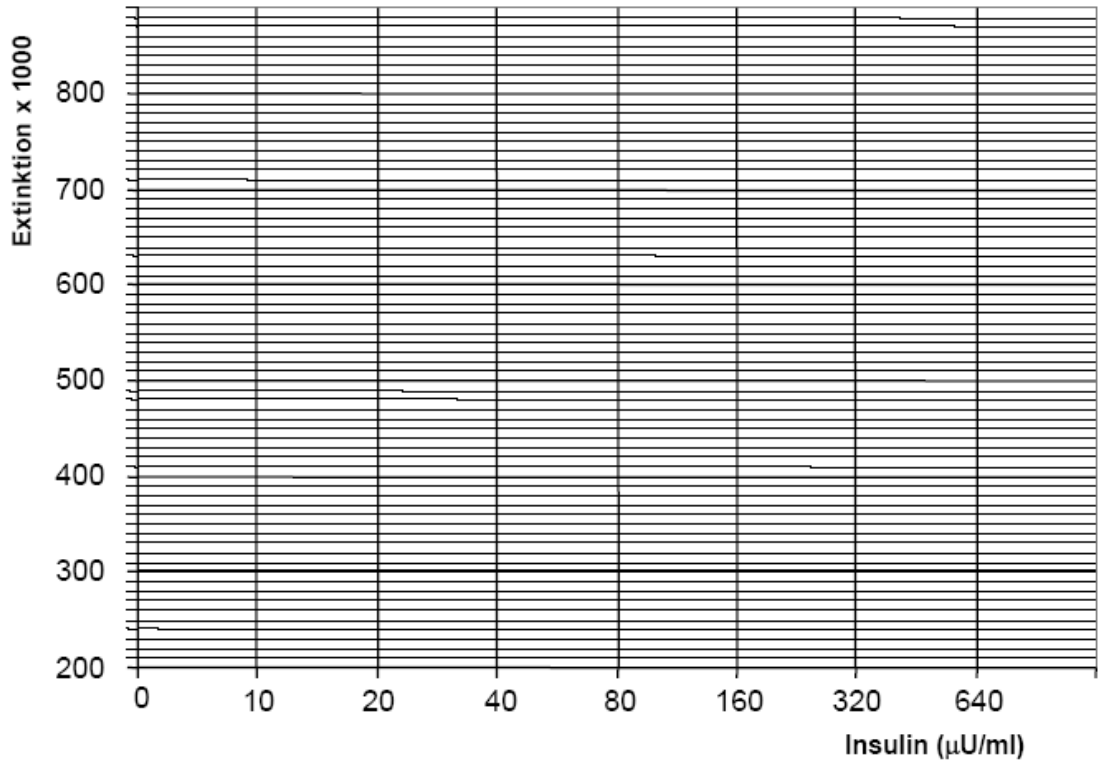


Tragen Sie hier nochmals die abgelesenen Extinktionswerte der Ansätze 7-18 und die daraus errechneten Glucosekonzentrationen (mg/dl) ein.

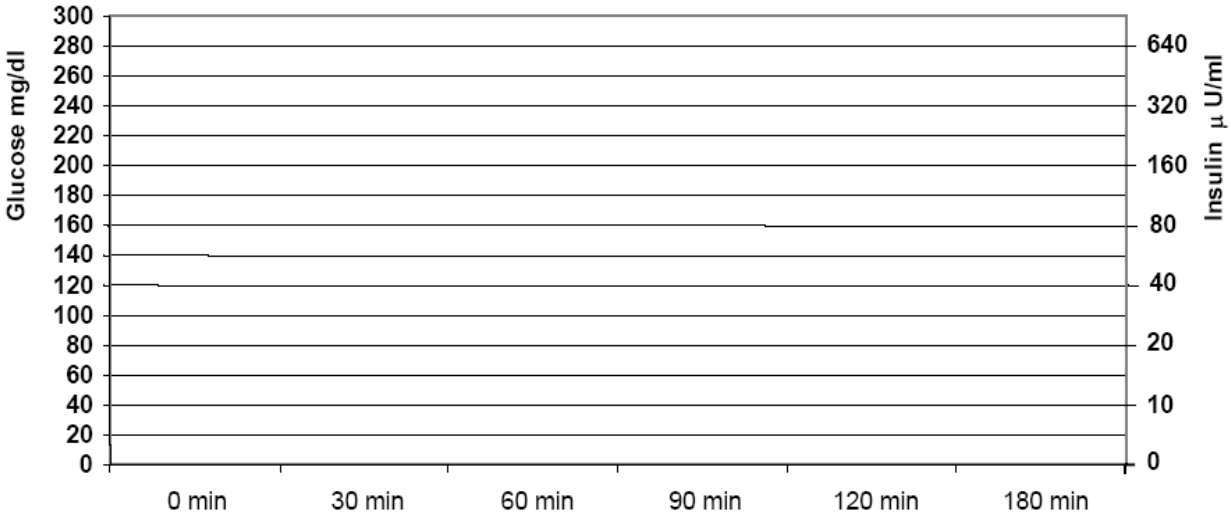
	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
E												
mg/dl												
	0min		30min		60min		90 min		120min		180min	

Versuch C:

Erstellung der Insulin-Standardgeraden: Tragen Sie die Extinktionswerte der Insulinstandards hier ein.



Tragen Sie hier die errechneten Glucose- und Insulinwerte aus den Versuchen B und C zusammen ein und diskutieren Sie den Verlauf. Entsprechen die Werte einer



Glucosetoleranz einer gesunden Person?

.....

.....

BIOCHEMISCHES PRAKTIKUM V

Blut: Hämoglobin, Eisenporphyrine, Eisenstoffwechsel,Blutgerinnung, glyciertes Hämoglobin

Aufgabe 1: **Quantitative Bestimmung von Hämoglobin als Hämoglobin-Cyanid**

Aufgabe 2: **Nachweis von Hämoglobin mit ABTS 2.2'-Azino-di[3-äthylbenzthiazolinsulfonat (6)]**

Aufgabe 3: **Isolierung und Bestimmung von Porphobilinogen aus Urin**

Aufgabe 4: **Bestimmung der Eisenkonzentration im Plasma**

Aufgabe 5: **Versuche zur Gerinnung**

Aufgabe 6: **Quantifizierung der HbA_{1c}-Fraktion im Blut**

Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
Biochemisches Institut
In der Medizinischen Fakultät
Olshausenstrasse 40, 24098 Kiel

Stichworte

- Struktur von Häm, Hämoglobin, Myoglobin
- Adult- und Fetalhämoglobin, Hb-Cyanid und CO-Hb
- Met-Hämoglobin
- Peroxidasen, Katalase
- Cytochrom c, Cytochromoxidase
- Häm-Synthese und ihre Regulation
- Porphyrien
- Ionenaustauschchromatographie
- Gelchromatographie
- Transferrin, Ferritin, Coeruloplasmin
- Eisenhaushalt
- Blutgerinnung
- Gerinnungsfaktoren
- Thromboplastinzeit, Thrombinzeit
- Hemmstoffe der Gerinnung
- Vitamin K
- Blutglucose
- Glycierung von Hämoglobin
- Diabetes

Einleitung

Grundlagen

Das Blut besteht aus zellulären Elementen (Erythrozyten, Granulozyten, Lymphozyten, Thrombozyten) und einer wässrigen Lösung, dem Blutplasma, das Proteine und anorganische Bestandteile enthält.

Neben den Funktionen, die sich aus seiner Rolle als Transportorgan für Gase, Wasser, Elektrolyte, Nährstoffe und Hormone sowie für die Schlackenausscheidung ableiten lassen, besitzt das Blut durch seinen Leukozyten- und Antikörpergehalt wichtige Eigenschaften zum Schutz des Körpers vor Krankheitserregern und deren Produkten.

Außerdem enthält es neben pH-Wert-regulierenden Puffersystemen das Gerinnungssystem, dessen biologische Bedeutung im Schutz des Körpers vor Blutverlusten bei Verletzung der Gefäße besteht.

Da das Blut mit allen Körperzellen in direktem oder indirektem Kontakt steht, spiegelt die Zusammensetzung des Blutes in vielfältiger Weise physiologische und pathologische Veränderungen der Körperorgane wider. Dieser Umstand, verbunden mit der Möglichkeit, dem Körper durch einfache Verfahren Blut zu entnehmen und es der Untersuchung zuzuführen, erklärt die große Bedeutung, die der Diagnostik des Blutes in der Medizin zukommt.

Je nach Fragestellung erweist es sich als notwendig, die Analysen am Vollblut, Plasma, Serum oder an isolierten Blutzellen durchzuführen.

Hämoproteine

Hämoproteine sind zusammengesetzte Proteine, die aufgrund ihrer Farbstoffnatur zu den Chromoproteinen gehören. Stoffwechselrelevante Vertreter dieser Stoffklasse sind beispielsweise das Hämoglobin, das Myoglobin, die Cytochrome der Atemkette sowie die Häminenzyme Katalase und Peroxidase. In den Eisenporphyrinproteinen sind die Porphyrine als prosthetische Gruppe mit Proteinen assoziiert.

Als Katalysatoren vielfältiger Reaktionen des Stoffwechsels sind die Hämverbindungen alle direkt oder indirekt an der Verwertung des Sauerstoffs für biologische Oxidationsvorgänge beteiligt, wobei immer der Eisenporphyrinring das „aktive Zentrum“ der katalytischen Funktion darstellt, die in der Bindung von

Sauerstoff, im Sauerstofftransfer auf Substrate oder im Elektonentransport bestehen kann.

Hämoglobin in Erythrozyten:

Der rote Blutfarbstoff, das Hämoglobin (Hb) ist das Hauptprotein des Erythrozyten. Es erfüllt im menschlichen Organismus folgende Funktionen:

Sauerstoff-Transport im Blut
Beteiligung am Kohlendioxid-Transport im Blut
Anteil an der Aufrechterhaltung des Blut-pH-Wertes (wichtigstes nicht-Bicarbonat-Puffersystem)

Hämoglobin ist aus 4 Untereinheiten aufgebaut. Jede Untereinheit enthält eine Peptidkette (Globin) und ein Häm (Protoporphyrin IX mit einem zentralen Eisenatom). Nur das zweiwertige Eisen (Fe^{2+}) ist in der Lage, den im Blut wenig löslichen Sauerstoff unter Bildung eines koordinativen Komplexes (HbO_2) reversibel zu binden, ohne dabei selbst oxidiert zu werden. Dieser als Oxygenierung bezeichnete Vorgang senkt den isoelektrischen Punkt von Hb geringfügig ab, was mit der Freisetzung von Protonen verbunden ist. Parameter wie Temperatur, pH-Wert, CO_2 – und O_2-Partialdruck beeinflussen die Anlagerung bzw. die Abgabe des Sauerstoffs. Die Sauerstoffkapazität des Blutes wird unter physiologischen Bedingungen nahezu ausschließlich von der Konzentration des Hb bestimmt. Kohlenmonoxid-Hämoglobin (COHb) und Methämoglobin (MetHb, Hämiglobin) sind nicht in der Lage, O_2 zu binden. Die Affinität von CO zum Hb ist gegenüber dem Sauerstoff 200-300-fach höher, so dass bereits eine geringe Konzentration des giftigen Gases die O_2-Transportfähigkeit des Blutes stark reduziert. Außerdem bedingt CO, dass die Abgabe des noch am Hb gebundenen O_2 in den Geweben erschwert ist. Eine erhöhte CO-Hb-Konzentration (1-15 %) findet man im Blut von Rauchern oder bei Personen, die durch Autoabgase stark belastet sind (z.B. Taxifahrer).

Häm

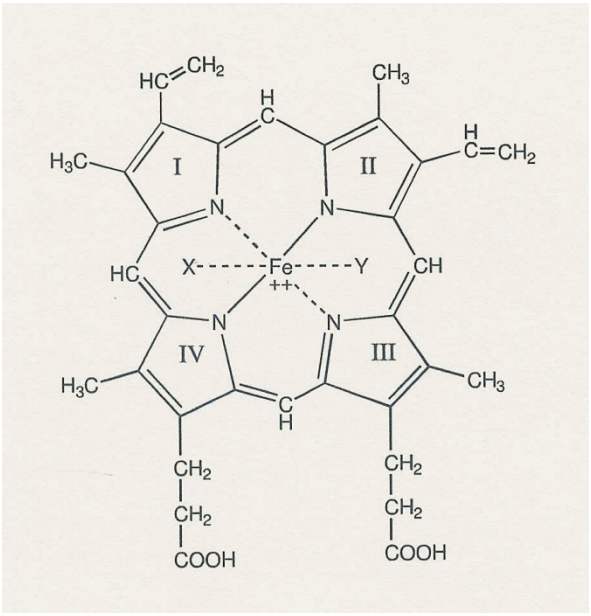


Abb. 1: Struktur des Häm

Globin

Das Globin, die Proteinkomponente des Hb ist ein schwach basisches Protein. Das Hb-Molekül enthält jeweils 2 Paare genetisch verschiedener Polypeptidketten (z. B. Hb A_0: α- und β-Ketten), von denen jede über einen His-Rest mit 1 Häm assoziiert ist.

Die besondere Tertiärstruktur des Globins schafft die Voraussetzung für die erfolgreiche Wirkungsweise in 4 Hämeinheiten im Hb. Schon kleinste Unterschiede in der Primärstruktur des Globins haben eine signifikante Änderung der Eigenschaften des Hb (O_2-Bindungsmöglichkeit, Löslichkeit usw.) zur Folge, Außerdem üben die Globinketten eine Stabilisatorwirkung auf das leicht oxidierbare Hämeisen aus. Fällt diese z.B. bei Denaturierung weg, tritt sofort ein Valenzwechsel von Fe^{2+} zu Fe^{3+} ein, der zu einem Verlust der O_2-Bindungsfähigkeit führt.

Die verschiedenen Hämoglobinarten unterscheiden sich ausschließlich in der Proteinkomponente. Im menschlichen Hb kommen neben den α- und β-Ketten auch δ- und γ- Ketten vor. Jedes physiologische Hb enthält ein Paar α-Ketten und Paar einer der anderen Ketten, nämlich:

$$HbA = \alpha_2 \beta_2$$

$$HbA_2 = \alpha_2 \delta_2$$

$$HbF = \alpha_2 \gamma_2$$

Hämoglobinopathien

Es gibt beim Menschen zahlreiche angeborene Störungen der Globinsynthese. Bei qualitativen Veränderungen ist die Hämoglobinsyntheserate normal, jedoch ist die Struktur einer oder mehrerer Ketten verändert. Bei ca. jedem 600. Menschen wird eine Abweichung in der Aminosäuresequenz gefunden, meist jedoch ohne klinische Symptome, da die veränderte Struktur sich nicht negativ auf den Sauerstofftransport auswirkt. Bei der Sichelzellanämie liegt eine Punktmutation (6Glu→Val) in der β-Globinkette vor, die zwar ebenfalls den Sauerstofftransport nicht tangiert, die aber bei homozygoten Trägern (beide Gene für die β-Globinsynthese betroffen) unter bestimmten Bedingungen zu einer Strukturänderung des Hämoglobins und in der Folge des ganzen Erythrozyten führen kann. Diese Sichelzellerythrozyten können sich zusammenlagern und damit zu Verstopfungen von feinen Gefäßen und damit zu bedrohlichen und teilweise sehr schmerzhaften Organinfarkten besonders in Knochen und Milz führen.

Bei quantitativen Änderungen der Globinsynthese liegt eine Reduzierung der Synthese der α- oder β-Kette vor. Bedingt durch verschiedene Mutationen im betreffenden Gen wird bei der homzygoten β-Thalassämie (Mittelmeeranämie) keine oder nur eine geringe Menge der β-Globin-Kette synthetisiert. Das Hämoglobin dieser Patienten ist dadurch sehr stark in seiner Funktion eingeschränkt, so dass eine lebenslange Transfusionsbedürftigkeit besteht.

Anämie

Eine Erniedrigung des Hämoglobingehalts im Blut unter den Normalwert wird als Anämie bezeichnet, die fast immer mit dem Absinken der Erythrozytenzahl verbunden ist. Ein solcher labordiagnostischer Befund kann seine Ursache in einer gestörten Erythropoese (z.B. Störungen der Hb-Synthese infolge eine Eisen- oder Vitamin B6 Mangels; Störungen der Erythrozytenreifung bei Vitamin B12 oder Folsäuremangel), einer verkürzten Lebensdauer der Erythrozyten (bei Membran oder Enzymdefekten der Erythrozyten) oder starken Blutverlust haben. Die Diagnostik und Verlaufskontrolle einer Anämie schließt die Bestimmung der Hämoglobin-konzentration, der Erythrozytenzahl und des Hämatokrits ein. Auch im Zusammenhang mit einer erhöhten Anzahl von Erythrozyten (Polyzythämie oder Polyglobulie), stellt die Hämoglobinkonzentration einen wichtigen diagnostischen

Parameter dar. Eine durch Erythropoietin (Epo) beschleunigte Bildung und Reifung von roten Blutzellen wird z.B. durch Sauerstoffmangel bei Lungeninsuffizienz oder in großen Höhen ausgelöst. Dieser Zusammenhang wird jedoch auch gezielt ausgenutzt, um durch Höhentraining oder durch die Gabe von Epo die Leistungsfähigkeit von Sportlern zu erhöhen.

Referenzbereich der Hb-Konzentration:

	Hb (mmol/l Blut)	Hb (g/dl Blut)
Neugeborene (1.-4. Tag)	10,0 bis 13,2	16,1 bis 21,3
Säuglinge (4.-12. Woche)	6,5 bis 7,8	10,5 bis 12,6
Kinder	6,8 bis 9,0	11,0 bis 14,5
Frauen	7,4 bis 9,7	11,9 bis 15,6
Männer	8,3 bis 11,0	13,4 bis 17,7

Blutstillung (Hämostase), Blutgerinnung

Die Blutstillung ist ein komplexer Vorgang, bei dem vaskuläre, zelluläre und plasmatische Vorgänge eng zusammen spielen.

Im Plasma wird die endgültige Blutstillung oder die Blutgerinnung nach einer Gewebeverletzung auf dem exogenen Wege (extravaskuläres oder extrinsisches System) durch Freisetzung von Gewebethromboplastin oder durch das endogene System (intrinsisches oder intravaskuläres System) mit Aktivierung durch Freilegung von Fremdoberflächen oder Kollagenfasern in verletztem Endothel ausgelöst. Das extravaskuläre System reagiert sehr schnell, das langsamere intravaskuläre System beinhaltet einen komplexen Kaskadenmechanismus bei dem verschiedene Gerinnungsfaktoren aus einer inaktiven Form (Proenzym-Form) in eine aktive Form überführt werden. Gemeinsame Endstrecke ist die Umwandlung von Prothrombin in die hochaktive Protease Thrombin, die aus Fibrinogen letztendlich das vernetzbare Fibrin als Endprodukt der Blutgerinnung bereitstellt.

Der biochemische Nutzen einer Enzymkaskade liegt in der schnellen Verstärkung des Signals und der vielfältigen Regulierbarkeit.

Das fibrinolytische System (Antikoagulation) kann Blutgerinnsel wieder auflösen und steht im Plasma des Normalgesunden mit der Gerinnung im Gleichgewicht. Blutgerinnung und Fibrinolyse sind lebenswichtige Mechanismen, die bei vielen Krankheiten beeinträchtigt sind und durch viele Medikamenten beeinflusst werden können (weitere Einzelheiten siehe Lehrbücher der Biochemie).

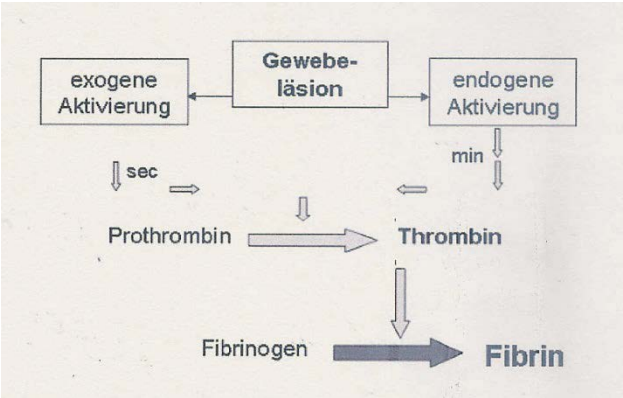


Abb. 2: Schematische Ablauf der Blutgerinnung im Plasma

BITTE SCHICKEN SIE ZU BEGINN DES PRAKTIKUMS PRO TISCH EINEN PRAKTIKANTEN ZUR BLUTABNAHME INS VORBEREITUNGSZIMMER!

a) Herstellung von Citrat-Plasma

9 ml Blut werden in einem graduierten Plastikreagenzglas (12 ml) mit 1 ml einer 0,11 M Lösung von Na-Citrat[1] versetzt und vorsichtig einmal durchgeschüttelt (Verdünnungsfaktor des Plasma F_1 = 10/9). Die Lösung wird sofort in einer Tischzentrifuge bei höchster Geschwindigkeit (Stufe 4) 10 min. lang zentrifugiert (GEGENGEWICHT). Danach wird das Reagenzglas vorsichtig aus der Zentrifuge genommen und das Citrat-Plasma sofort mit einer 1 ml-Eppendorfpipette in ein zweites sauberes und trockenes Plastikreagenzglas pipettiert. (Sie benötigen mind. 5 ml Plasma pro Tisch.)

Bitte notieren Sie sich das Volumen des Erythrozyten-Niederschlages am Boden des ersten Reagenzglases. Dieses Volumen benötigen Sie für spätere Berechnungen, da es Ihnen ungefähr den Anteil des Volumens angibt, das die Erythrozyten im Blut einnehmen (Hämatokrit).

Beispiel: Volumen Ery = 3,5 ml; $$\mathrm{Hk} = \frac{V_{ery}}{V_{ges}} \times F_1 \times 100$$

Die Erythrozyten machen also 39% des Blutvolumens aus, der Verdünnungsfaktor des Erythrozytenvolumens durch das Plasma beträgt F_2 = 10/3,9.
Genaue Bestimmungen sind allerdings nur unter standardisierten Bedingungen möglich.

b) Herstellung von Hämolysat

1 ml Blut wird in einem graduierten Plastikreagenzglas (12 ml) mit 9 ml einer 0,05%igen Detergenslösung[1] versetzt und gut durchgeschüttelt. Es muss eine klare rote bis rotbraune Lösung entstehen (Verdünnungsfaktor des Hämolysates F3 = 10/1).

---

[1] * Lösungen sind im Vorbereitungszimmer vorhanden.

Die Hämolyse ist erst vollständig, wenn die Beschriftung des Reagenzglases von der Rückseite durch die Lösung hindurch gut gelesen werden kann.

Für die folgenden Aufgaben benötigen Sie:

Aufgabe	
1. Hämoglobin-Bestimmung	400 µl Hämolysat (b)
2. Peroxidase-Wirkung des Hämoglobins	Hämolysat (b), weiter auf 1:1000 verdünnt
4. Eisen im Plasma	0,5 ml Citratplasma (a)
5. Gerinnung	0,1 ml Citratplasma (a)

Aufgabe 1: Quantitative Bestimmung von Hämoglobin als Hämoglobin-Cyanid

Prinzip:

Zur photometrischen Bestimmung muss Hämoglobin in ein Derivat überführt werden, das stabil und dessen Extinktion zeitlich konstant ist. Hier hat sich die Cyanid-Verbindung des Methämoglobins bewährt: Hämoglobin wird durch $K_3Fe(III)(CN)_6$ zu Methämoglobin oxidiert und anschließend mit Hilfe von KCN in die Cyanid-Verbindung überführt. Diese Verbindung hat ein breites Absorptionsmaximum bei 541 nm und kann deshalb mit großer Empfindlichkeit bestimmt werden.

$$Hb(II) + [Fe(III)(CN)_6]^{3\ominus} \rightleftharpoons Hb(III) + [Fe(II)(CN)_6]^{4\ominus}$$

$$\downarrow + CN^{\ominus}$$

$$CN\text{-}Hb(III)$$

Achtung:	**VORSICHT BEIM UMGANG MIT DER TRANSFORMATIONS-LÖSUNG! (KCN!!).** **NICHT SÄUREN UND KCN ZUSAMMEN IN DEN AUSGUSS GEBEN!** **KCN IM GEKENNZEICHNETEN ABZUG SAMMELN!** **DISPENSER BENUTZEN; KEINE PIPETTE!**

Experimentelle Ausführung:

Reagenz: Transformationslösung enthält
0,025 % $K_3Fe(CN)_6$
0,025 % KCN

Geräte: Eppendorf-Photometer 546 nm
5 ml Vollpipette
3 graduierte Röhrchen

Ausführung: In 3 graduierte Röhrchen pipettieren
(Doppelbestimmung + Leerwert)
2 Messansätze: 200 µl Hämolysat
5 ml Transformationslösung (Dispenser)
1 Leerwert: 200 µl H_2O
5 ml Transformationslösung (Dispenser)

Nach 5 Minuten Inkubation wird die Extinktion der Messansätze gegen Leerwert bei 546 nm im Eppendorf-Photometer bestimmt.

Aufgabe 2: Nachweis von Hämoglobin mit ABTS 2.2'-Azino-di [3-äthylbenzthiazolinsulfonat (6)]

Prinzip: Peroxidasen katalysieren die Reaktion (D für Donator):

$DH_2 + H_2O_2 \rightarrow D + 2H_2O$

Katalasen verwenden H_2O_2 als H_2 - Donator:

$H_2O_2 + H_2O_2 \rightarrow O_2 + 2H_2O$.

Bei genetisch bedingtem Fehlen von Katalase resultieren keine Störungen: Das giftige, von vielen Oxidoreduktasen (insbes. Flavoproteinen) erzeugte H_2O_2 kann durch die Peroxidasen beseitigt werden. Katalase und Peroxidasen sind eisenhaltige Proteine, die intrazellulär in den Peroxisomen gelagert werden. Hämoglobin besitzt eine (Pseudo)peroxidase-Wirkung, die zu einem sehr empfindlichen Nachweis verwendet werden kann. Der Effekt ist nicht an das Vorhandensein nativen Globins gebunden, sondern eine Eigenschaft des Häms.
Beim Vorliegen eines wirksamen Katalysators werden Benzidin und Benzidinderivate durch H_2O_2 zu Diphenochinondiiminen dehydrogeniert; dehydrogenierte und nicht dehydrogenierte Moleküle bilden tiefblaue 1:1-Molekülkomplexe. Dieser sehr empfindliche Hämoglobin-Nachweis wird in der forensischen und in der klinischen Medizin verwendet (Blutspuren an Gegenständen, Faeces oder Harn).

Experimentelle Ausführung: Man gibt in 4 Reagenzgläser:

1. 1 Spatelspitze Eisen(II)sulfat + 3 ml H_2O
2. 3 ml stark verdünntes Hämolysat
   (1:10000 Gesamtverdünnung)
3. 3 ml aufgekochtes Hämolysat (Verdünnung 1:10000)
4. 3 ml H_2O (Leerwert)

und setzt zu jedem Reagenzglas wenige Tropfen ABTS-H_2O_2 -Lösung hinzu. Frisch angesetzte Reagenzlösung vom Kursassistenten holen und sofort verwenden!

Aufgabe 3: Isolierung und Bestimmung von Porphobilinogen aus Urin

Vorstufen von Eisenporphyrinen

Der Nachweis von Porphyrinvorstufen hat klinisch-diagnostische Bedeutung (vgl. "Klinischer Anhang" S. 170). Im Kurs dient die Bestimmung der Vorstufe Porphobilinogen auch zum Kennen lernen der wichtigen Methode der Ionenaustauschchromatographie.

Prinzip:
Porphobilinogen kann direkt im Urin mit Hilfe eines modifizierten Ehrlich-Reagenz (salzsaure Lösung von 4-Dimethylamino-benzaldehyd) bestimmt werden. Die Resultate sind aber nicht sehr genau; für zuverlässige Untersuchungen muss die Substanz zuerst isoliert werden. Zur Isolierung von Porphobilinogen (wie auch von δ-Aminolävulinsäure) wird heute die Ionenaustauscher-Chromatographie auf DOWEX nach MAUZERALL und GRANIK oder eine HPLC-Methode (Hochdruckflüssigkeitschromatographie) mit einem dafür geeigneten Anionentauscher verwendet.

Zur Methode des Ionenaustausches:
Bei Adsorptionsvorgängen, die auf der Anziehung heteropolarer Teilchen beruhen, kann eine Ablösung auch durch Austausch erfolgen. Dabei werden die gebundenen Teilchen (Ionen) an das Medium abgegeben und an deren Stelle andere, dem System zugefügte Ionen gebunden. Dieser Vorgang heißt Tauschadsorption.
Die Einführung von Kunstharz-Polyelektrolyten hat den Anwendungsbereich der Tauschadsorption wesentlich erweitert. Kunstharz-Ionenaustauscher werden heute in der Medizin für verschiedene Zwecke benutzt: als Medikament zum Entzug von Kalium, in der Diagnostik zur sondenlosen Funktionsprüfung der Magensaftsekretion oder in der Diätetik zur Herstellung kalziumarmer Milch.
Ionenaustauscher sind hochmolekulare Polyelektrolyte (z.B. Polystyrolharze, Polyacrylsäure, Polyvinylverbindungen), bestehend aus einem vernetzten Gerüst, an welchem die Ladungen fixiert sind (= Fest-Ionen). Je nach Art dieser Gruppen unterscheidet man Kationen- oder Anionenaustauscher. Die heteropolar gebundenen austauschbaren Ionen werden als Gegen-Ionen bezeichnet.

Bei Kationenaustauschern bestehen die Ankergruppen oder Fest-Ionen meist aus Sulfonsäureresten ($-SO_3^-$ bzw.$-SO_3H$; stark sauer) oder Carboxylgruppen ($-COO^-$ bzw.-COOH; schwach sauer). Anionenaustauscher tragen meist primäre, sekundäre oder tertiäre Aminogruppen. Je nach Art der Gegen-Ionen liegt ein Austauscherharz entweder in Säure- (Basen-) oder Salzform vor. Je nach pH und Zusammensetzung der Lösung, mit der das Harz in Berührung kommt, erfolgt ein Austausch dieser Gegen-Ionen.

Die Korngrößen der Ionenautauschermaterialien werden in mm oder im angelsächsischen Sprachraum nach genormten Siebgrößen in mesh-Zahlen angegeben. Aus der Kapazität eines Ionenaustauschers kann abgelesen werden, wie viel Gegen-Ionen ein Austauscher aufzunehmen vermag. Sie wird in mmol/g angegeben. Ist das Aufnahmevermögen des Austauschers erschöpft, kann dieser regeneriert werden. Dies geschieht im Falle eines Kationenaustauschers durch Auswaschen mit verdünnter Salzsäure, wobei Na^+ oder andere Kationen in Lösung gehen; der Austauscher geht dabei von der Salz- in die Säureform über. Entsprechend können Anionenaustauscher durch Spülen mit verdünnten Alkalien regeneriert werden.

Versuchsanordnung

Zur Chromatographie dient ein Plastikrohr von 0.7 x 30 cm, mit etwas Glaswolle eingestopft. Darin befinden sich ca. 2 ml eines Anionenaustauscher-Harzes (Dowex 2). Die Säule ist für den Versuch bereits fertig vorbereitet, indem die im Handelspräparat vorhandenen Chloridionen durch Auswaschen mit 3 M Na-Acetat-Lösung entfernt wurden. Anschließend wurde das überschüssige Na-Acetat durch Waschen mit Aqua dest. entfernt. Das Anionenaustauscher-Harz enthält jetzt als Gegen-Ionen Acetat. Wird Urin mit pH 5-7 auf die Säule gegeben, so wird Porphobilinogen mit den 2 Carboxylgruppen pro Molekül adsorbiert, während andere Urinbestandteile durchlaufen. Das Porphobilinogen wird anschließend mit Essigsäure eluiert und photometrisch mit einem modifizierten Ehrlich-Reagenz bestimmt.

Modifiziertes Ehrlich-Reagenz nach Remington:

60 g 4-Dimethylamino-benzaldehyd werden in 260 ml konz. Salzsäure gelöst und mit Eisessig auf 1000 ml verdünnt.

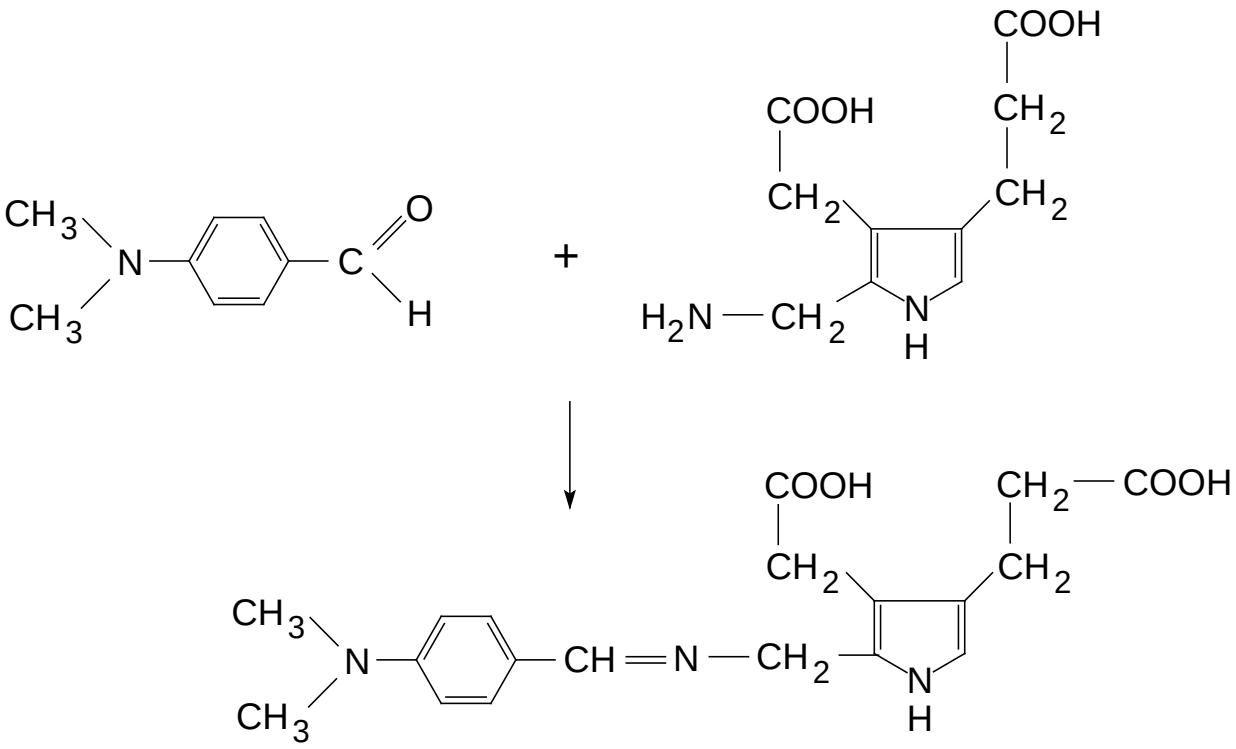


Abb.5: 4-Dimethylamino-benzaldehyd + Porphobilinogen —> rotes Kondensationsprodukt

Vorgehen:

1. 1 ml Urin (pH evtl. auf 5-7 eingestellt; der ausgegebene Harn ist bereits fertig eingestellt) mit Eppendorf-Pipette (1000 µl) auf die Säule geben und 2x je 2 ml Aqua dest. nach Sinken des Flüssigkeitsspiegels in den Bereich der Geloberfläche zufügen. Die Eluate werden verworfen. VORSICHT: Die Säule nie trocken laufen lassen!!!!
2. Das adsorbierte Porphobilinogen wird von der Säule mit 1 ml 1M Essigsäure eluiert. Diese Eluate werden in einem Reagenzglas mit 10 ml Markierung gesammelt. Nach dem Ausfließen wird 2 x mit 1 ml 0,2M Essigsäure nachgespült und das Eluat mit 0,2M Essigsäure auf 5 ml aufgefüllt. 3. Zu 2 ml der Lösung werden 2 ml Ehrlich-Reagenz (GIFTIG! Achtung: Hierbei Nitril-

Handschuhe tragen „lila“) gegeben. Bei Vorhandensein von Porpho-bilinogen bildet sich ein roter Farbstoff.

4. Nach 15 min wird die Extinktion bei 546 nm im Eppendorf-Photometer gegen einen Leerwert aus 2 ml Ehrlich-Reagenz und 2 ml 0,2 M Essigsäure abgelesen. Die Farbe ist danach nur ca. 15 min stabil.
5. Aus einer aushängenden Eichkurve wird die Konzentration abgelesen und die 24 h-Ausscheidung ausgerechnet. (Durchschnittliche Menge: 1,5 l/24 h).

Normalwerte: 6,2 - 7,5 µmol/24 h (1,4 - 1,7 mg/24 h)
Erhöhte Ausscheidung bei akuter Porphyrie.

Anmerkung: Es ist leicht möglich, auch die δ-Aminolävulinsäure (die in dem von uns jetzt verworfenen Eluat vorliegt) durch eine anschließende zweite Chromatographie mit einem Kationenaustauscher zu isolieren; dies aufgrund ihrer primären protonisierten Aminogruppe.

Aufgabe 4: Bestimmung der Eisenkonzentration im Plasma

Zum Eisenstoffwechsel

Prinzip:

Bei dem gebräuchlichsten, hier verwendeten Verfahren werden zunächst die trüben, fetthaltigen Bestandteile des Plasmas mit Detergens in Lösung gebracht und gleichzeitig durch Änderung des pH-Wertes das 3-wertige Eisen von seinem Transportprotein, dem Transferrin, gelöst. Durch Zugabe des Chromogens[2] wird ein Farbkomplex gebildet, dessen Extinktion bei 578 nm gemessen wird. Da der Farbkomplex des 2-wertigen Eisens stabiler ist als der des 3-wertigen, wird vor der Zugabe des Chromogens mit Ascorbinsäure (Vitamin C) reduziert.

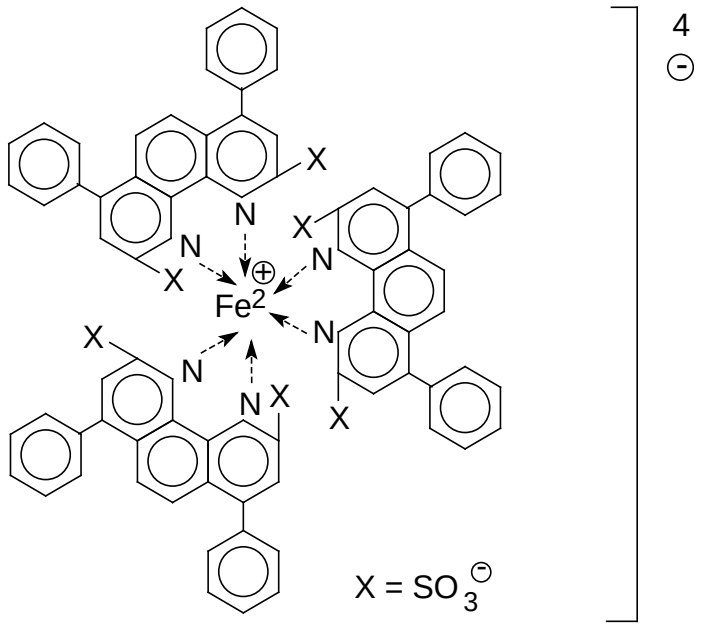


Abb. 6: Struktur des Eisenkomplexes, dessen Konzentration photometrisch bestimmt wird

[2] z.B. Bathophenanthrolin (4,7-diphenyl-1.10-phenanthrolin-disulfat) oder Analoga

Ausführung:

Drei Plastikküvetten werden folgendermaßen beschickt:

	Leerwert	**Standard**	**Analyse**
Detergens/Puffer (pH=5.5) mit Ascorbinsäure	1,0 ml	1,0 ml	1,0 ml
dest. Wasser	0,1 ml	-	-
Eisen-Standard	-	0,1 ml	-
Citratplasma	-	-	0,1 ml

Man lässt es 10 min bei Raumtemperatur stehen, setzt 200µl Chromogen je Küvette zu, mischt und misst innerhalb einer Minute die Extinktion des Standards und der Analyse gegen den Leerwert (Leerwert auf "Null" abgleichen) im Eppendorf-Photometer bei 578nm. Da die Methode sehr empfindlich ist, sollt jeder Ansatz mit einem anderen Plastikspatel gemischt werden.

Dieser Versuch (Eisen-Bestimmung im Plasma) und Versuch 1 (Hämoglobin-Bestimmung) zeigen 2 Möglichkeiten auf, die bei der Konzentrationsbestimmung mit Hilfe der Absorptionsphotometrie angewandt werden können. Zum einen wird gleichzeitig mit der unbekannten Lösung eine Standardsubstanz mit genau bekannter Konzentration gemessen und aus dem Verhältnis der Extinktion und der bekannten Konzentration die unbekannte Konzentration errechnet. Zum anderen kann eine unbekannte Konzentration mit Hilfe des Lambert-Beer'schen-Gesetzes bei Kenntnis des molaren Extinktionskoeffizienten direkt ohne eine zusätzliche Messung ermittelt werden.

Aufgabe 5: Versuche zur Gerinnung

a) Beteiligung des Calciums

Prinzip:

Versetzt man Blutplasma, das die Gerinnungsfaktoren I (Fibrinogen), II (Prothrombin), V (Proaccelerin), VII (Proconvertin) und X (Stuart-Faktor) enthält, mit Gewebsthromboplastin (Faktor III), so wird sehr schnell ein Gerinnungsprozess eingeleitet, wenn Ca^{2+} in genügender Menge zur Verfügung steht. Sind die Ca^{2+}-Ionen jedoch, wie im Falle des Citrat-Plasma, komplex gebunden, so dauert der Gerinnungsprozess sehr lange.

Ausführung:

In zwei aufeinander folgenden Ansätzen wird auf den Boden von zwei Plastikröhrchen nacheinander pipettiert:

	Ansatz 1	**Ansatz 2**
Citratplasma	10 µl	10 µl
Gewebsthromboplastin (Hepato Quick)	200 µl	200 µl
2 Min im Wasserbad bei 37°C inkubieren, dann		
0,01 M $CaCl_2$ (37°C)	100 µl	-
H_2O dest. (37°C)	-	100 µl

Sofort nach Ca^{2+}- oder H_2O-Zugabe wird eine Stoppuhr (oder der Sekundenzeiger der Armbanduhr) gestartet und eine (vorher ausgeglühte und abgekühlte) Metallöse 1-2 mal/sec durch das Gemisch gezogen. Sobald ein Fibringerinnsel an der Öse hängen bleibt, wird die Zeit gestoppt.

Die Kontrolle der Gerinnungszeit mit Faktor III und Ca^{2+} nach "Quick" (= Thromboplastinzeit) besitzt klinische Bedeutung zur Kontrolle einer Antikoagulantien-therapie mit Vitamin K-Antagonisten (Cumarinen).

Vitamin K-abhängig ist die Biosynthese der Faktoren II, VII, X und IX, von denen die ersten Drei mit dem Test erfasst werden.
Da die genannten Faktoren alle in der Leber synthetisiert werden, lässt eine Veränderung der Gerinnungszeit auch eine Schädigung des Leberparenchyms erkennen.

b) <u>Einwirkung von Thrombin</u>

<u>Prinzip</u>:
Der letzte Schritt der Gerinnungskaskade ist die Einwirkung von Thrombin (Faktor IIa) auf Fibrinogen (Faktor I). Die Protease Thrombin spaltet dabei zwei kleine Peptide (Fibrinopeptide A und B) von der α- bzw. ß-Kette des Fibrinogens ab, das entstehende Fibrin gerinnt spontan. Prüfen Sie, ob die Reaktion Ca^{2+}-abhängig ist oder durch den Gerinnungshemmstoff Heparin (einem sulfatreichen Mucopolysaccharid aus Mastzellen, Lunge oder Leber) beeinflusst wird.

<u>Ausführung</u>:
Wie bei a) auf den Boden von drei Plastikröhrchen nacheinander pipettieren:

	Ansatz 1	Ansatz 2	Ansatz 3
Citratplasma	100 µl	100 µl	100 µl
0.01 M $CaCl_2$	-	100 µl	-
0.4 U/ml Heparin	-	-	100 µl
H_2O	200 µl	100 µl	100 µl

2 min im Wasserbad bei 37°C inkubieren, dann mit je 100 µl Thrombinlösung starten.

Bestimmen Sie wie bei a) die Gerinnungszeiten und diskutieren Sie die Unterschiede.

Um ungeronnene Blutproben zu erhalten, kann man Heparin einsetzen oder das Ca^{2+} durch Komplex- (Citrat, EDTA) oder Niederschlagbildung (Fluorid) entfernen.

Heparin wird darüber hinaus auch therapeutisch eingesetzt, seine Wirkung kann durch Proteinkationen (Protaminchlorid) wieder aufgehoben werden. Neben Thrombin wird auch Faktor IXa (aktivierter Christmas-Faktor, intravaskuläres System) und Faktor Xa (aktivierter Stuart-Faktor) gehemmt.

Mit der Thrombin-Gerinnungszeit kann der Plasma-Fibrinogen-Gehalt erfasst werden, wichtig z.B. bei Störungen der Fibrinogenbildung (genetische Defekte, Leberschäden) bzw. erhöhtem Fibrinogenverbrauch (Verbrauchskoagulopathie, gesteigerte Fibrinolyse).

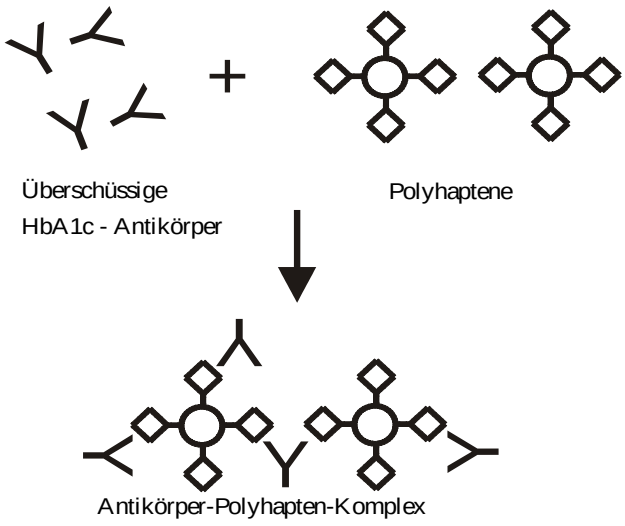
Klinischer Anhang

Störungen der Biosynthese von Häm-Porphyrien

Bei den Porphyrien werden Porphyrine, Porphyrinogene und ihre Vorstufen vermehrt gebildet und entweder im Gewebe abgelagert oder im Harn bzw. Kot ausgeschieden. Die meisten Porphyrien sind angeborene und vererbbare Enzymopathien. Analog zu den erblichen Störungen des Aminosäurestoffwechsels ist nicht die durch Enzymausfall bedingte Minderproduktion von Blutfarbstoff die Krankheitsursache, sondern die Giftwirkungen von neu entstehenden "falschen" Porphyrinisomeren oder von liegen bleibenden Zwischenprodukten.

Zur nachfolgenden Tabelle:

ad 1): Ausbleiben der durch die Uroporphyrinogen-Cosynthetase bewirkten Isomerisierung führt zur stark vermehrten Produktion von Porphyrinen der Reihe I (regelmäßig alternierende 2- und 3-Seitenketten), die weder Eisen Aufnehmen, noch wieder abgebaut werden können und durch ihre Lichtabsorption und Fluoreszenz Lichtdermatosen verursachen.



Normalerweise machen diese Porphyrine unter 0,1% der gesamten Syntheseprodukte aus.

ad 2a): Absinken der Häm-Konzentration führt zur allosterischen Aktivierung und Derepression von ALA-Synthetase. Klinisch bestehen keine Lichtdermatosen; die vorherrschenden neurologischen Symptome sind vermutlich durch Hemmwirkung von δ-Aminolävulinat und Porphobilinogen auf Membran-transportvorgänge und präsynaptische Übertragung zurückzuführen. Induktoren der ALA-Synthetase (Barbiturate, Kontrazeptiva u.a.) lösen Anfälle aus. Glucose hemmt die Induzierbarkeit des Enzyms.

ad 2b): Die Enzymschwäche bleibt ohne Belastung durch Arzneimittel (vor allem Alkohol, aber auch Östrogene, Chloroquin, nicht Barbiturate) meist latent. Die Dermatosen sind nicht eindeutig lichtabhängig.

"Symptomatische" Porphyrien mit ähnlichen klinischen Erscheinungen werden bei Vergiftung mit Blei, Phosphor, Quecksilber und Hexachlorbenzol auch ohne erbliche Prädisposition beobachtet.

Störungen der Biosynthese von Häm

Stoffwechselkrankheit Erbgang	Befund	Ursache	Klinische Symptomatik
1. Porphyria erythropoetica (Morbus Günther) rezessiv Manifestation im 1. - 5. Lebensjahr	Urin: Uroporphyrin I und Koproporphyrin I stark erhöht. Rotfärbung auch im Dunkeln. Faeces: Koproporphyrin I vermehrt Uroporphyrin I und Koproporphyrin I in Erythroblasten und Erythrozyten; Nachweis durch Fluoreszenztechnik	Relativer Mangel an Uroporphyrinogen-III-Cosynthetase (Isomerase)	Lichtdermatosen (Rötung, Blasenbildung). Dunkelrosarote Verfärbung und Fluoreszenz von Zähnen ("Erythrodontie") und Nägeln. Hämolytische Anämie, Milztumor.
2. Porphyria hepatica **a) acuta intermittens** dominant Manifestation im 20. – 40. Lebensjahr	Urin: δ-Aminolävulinsäure (ALA) und Porphobilinogen stark erhöht, Uroporphyrinogen und Uroporphyrin leicht erhöht. Urin bei Lichteinwirkung dunkelrot.	Aktivitätsminderung der Uroporphyrinogen-III-Synthase. Sekundäre Derepression und Aktivitätssteigerung der ALA-Synthase	Abdominelle Koliken, Erbrechen, Areflexien, aufsteigende Paresen u.a. neurologische Symptome.
b) Cutanea tarda erbliche Disposition Manifestation im 40. – 60. Lebensjahr	Urin: Sehr selten ALA oder Porphobilinogen erhöht. Uroporphyrin III stark erhöht, Koproporphyrin leicht. Eisenvermehrung in der Leber; oft Leberzirrhose.	Aktivitätsverminderung der Uroporphyrinogen-Decarboxylase	(Licht)dermatose mit ekzematösen Veränderungen. Überpigmentierung. Lebervergrößerung.

Praktische Aufgaben 1 bis 6

Praktikumsgruppe:
Namen der Praktikanten:

Aufgabe 1:

	Probe 1	**Probe 2**	**Leerwert**
Messwert			
Hb-Konzentration			

Zu berechnen: Die Konzentration des Hämoglobins im Blut in g/100 ml. Das Molekulargewicht des Hämoglobins beträgt 64500 (Tetramer).
Berechnungsgrundlage ist das Lambert-Beer'sche Gesetz: $E = \varepsilon \cdot c \cdot d$.
d stellt die Schichtdicke der Küvette dar (1 cm). Der molare Extinktionskoeffizient εdes CN-Hb(III) bei 546 nm beträgt 44000 [$L \cdot cm^{-1} \cdot mol^{-1}$] (Tetramer).
Es muss berücksichtigt werden, dass das Hämolysat durch die Transformationslösung um den Faktor F_4= 5.2/0.2 und das Blut zur Herstellung des Hämolysats um den Faktor F_3 verdünnt wurde, außerdem ist die Umrechnung von der molaren Konzentration in g/100 ml vorzunehmen

$$C_{Blut} = \frac{E}{\varepsilon \cdot d} F_3 F_4 \left(\frac{mol}{l} \right)$$

$$C_{Blut} \frac{E}{\varepsilon \cdot d} F_3 F_4 \frac{64500}{10} \left(\frac{g}{100\,ml} \right)$$

Normalwerte:
Männer: 2,2 - 2,8 mmol/l 14-18 g/100 ml
Frauen: 1,9 - 2,5 mmol/l 12-16 g/100 ml
Aus dem Hämoglobingehalt ergibt sich gleichzeitig der Eisengehalt der Erythrocyten. Bitte vergleichen Sie Erythrocyten-Eisengehalt (in mmol/l) mit dem Plasma-

Eisengehalt (Aufgabe 4). Berücksichtigen Sie dabei, dass sich das Volumen der Erythrocyten um den Faktor

$$C_{Ery} = C_{Blut} \cdot F_{2\ (siehe\ Seite\ 151)}$$

unterscheidet.

Diskussion der Ergebnisse:

.....

.....

.....

.....

.....

.....

Aufgabe 2:

Welche Beobachtung haben Sie bei den einzelnen Ansätzen gemacht?

Ansatz	**Beobachtung**
1	
2	
3	
4	

Diskussion der Ergebnisse:

.....

.....

.....

.....

.....

.....

Aufgabe 3:

	Probe	**Leerwert**
Messwert		
Porphobilinogen-Konzentration		
Menge / 24h		

Bitte berücksichtigen sie die Verdünnung im Verlaufe des Expermimentes !!

Diskussion der Ergebnisse:

.....

.....

.....

.....

.....

.....

Aufgabe 4:

	Leerwert	**Standard**	**Analyse**
Messwert			
Fe-Konzentration [µg/ml]			
Fe-Konzentration [µmol/l]			

Die Berechnung der Eisenkonzentration im Serum erfolgt mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes bei Berücksichtigung der Plasmaverdünnung um den Faktor F_1 in der Form:

$$\frac{E_{Standard}}{F_1 \cdot E_{Analyse}} = \frac{c_{Standard}}{c_{Plasma}}$$

Die Eisenkonzentration des Standards beträgt 166 µg/100 ml.
Das entspricht:

1660 µg/ml oder 1660 / 55,85 µmol/l (Molmasse Fe: 55,85)

Bitte geben Sie den Gehalt des Plasmas an Eisen in µmol/l an.
Die Normalwerte sind geschlechtsabhängig:

Männer 14,3 - 26,9 µmol/l
Frauen 10,7 - 25,1 µmol/l

Berechnen Sie bitte ferner mit Hilfe der Konzentration und der Extinktion des Standards den Extinktionskoeffizienten des Lambert-Beer'schen Gesetzes: $E = \varepsilon \cdot c \cdot d$ (d = 1 cm). Bedenken Sie dabei, dass der Standard im Laufe des Messansatzes mit Detergens verdünnt wurde.

Diskussion der Ergebnisse:

.....
.....
.....
.....
.....

Aufgabe 5:

a) Geben Sie bitte die beiden Gerinnungszeiten an und diskutieren Sie den Unterschied:

.....
.....
.....
.....
.....
.....

b) Bestimmen Sie wie bei a) die Gerinnungszeiten und diskutieren Sie die Unterschiede.

.....

.....

.....

.....

.....

.....

BIOCHEMISCHES PRAKTIUM VI

Leber und Leberstoffwechsel: Aminosäuren, Nukleotide, Hämoglobin, Cholesterin, Lipoproteine, Serum-Enzymdiagnostik

Aufgabe 1: **Bestimmung der Aktivität der Alanin-Amino-Transferase (ALT) im Serum**

Aufgabe 2: **Bestimmung der Harnstoffkonzentration im Harn mit Urease**

Aufgabe 3: **Aktivitätsbestimmung von Xanthinoxidase und Uricase. Allopurinolwirkung**

Aufgabe 4: **Bestimmung des Gesamt-Bilirubins und des konjugierten ("direkten") Bilirubins im Serum mit der Diazoreaktion nach Jendrassik-Gróf**

Aufgabe 5: **Bestimmung des Gesamtcholesterins, des HDL-Cholesterins und des LDL-Cholesterins im Serum**

Aufgabe 6: **Nachweis von Harnindikan**

Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
Biochemisches Institut
In der Medizinischen Fakultät
Olshausenstrasse 40, 24098 Kiel

Stichworte

- Transaminierung, Desaminierung (Stoffwechsel der Aminosäuren),
- Enzymreaktion der Alanin-Amino-Transferase (ALT)
- Funktion von Pyridoxal-P
- Harnstoffbildung, Urease,
- Abbau des Blutfarbstoffes, Ikterus,
- Abbau der Purinbasen, Gicht,
- Abbau und Transport von Cholesterin, Gallensäuren,
- Entgiftungsreaktionen.

Einleitung

Die Leber als das wichtigste Stoffwechselorgan des Organismus enthält 60-70% Leberparenchymzellen (Hepatozyten) und Nicht-Parenchymzellen wie Endothelzellen, Kupfferzellen und Itozellen. Die meisten metabolischen Aktivitäten der Leber sind in den Hepatozyten lokalisiert. Sie betreffen insbesondere den Kohlenhydratstoffwechsel (vergl. auch Praktikum 4) innerhalb dessen die Leber das wichtigste Glykogenspeicherorgan des Organismus ist. Da sie darüber hinaus über die Fähigkeit zur Gluconeogenese verfügt, spielt sie eine zentrale Rolle im Rahmen der Glucosehomöostase. Auch im Lipidstoffwechsel ist die Leber von ausschlaggebender Bedeutung. Sie synthetisiert aus Lipiden und Kohlenhydraten Triacylglycerin-reiche Lipoproteine, die VLDL (Very Low Density Lipoprotein). Diese werden von der Leber sezerniert und in den extrahepatischen Geweben metabolisiert. Dabei entstehen IDL (Intermediate Density Lipoprotein), die die Vorstufen der LDL (Low Density Lipoprotein) bilden. In der postresorptiven und besonders in der Hungerphase nimmt die Leber aus dem Blut große Mengen an Fettsäuren auf, die jedoch nur zum Teil zur Deckung des Energiebedarfes herangezogen werden, zum Teil dagegen in Acetacetat und γ-Hydroxybutyrat umgewandelt und wieder abgegeben werden.

Eine große Zahl von Proteinen des Blutplasmas werden in der Leber synthetisiert und von ihr sezerniert, so dass sie auch im Aminosäure- und Proteinstoffwechsel eine wichtige Rolle spielt.

Neben diesen metabolischen Funktionen ist die Leber ein wichtiges Speicherorgan vor allem für Vitamine und Spurenelemente. Dies trifft vor allem für fettlösliche Vitamine, sowie für Folsäure und Vitamin B_{12} zu.

Eng mit der Funktion der Leber als Ausscheidungsorgan verbunden ist ihre Fähigkeit, im Organismus selbst hergestellte bzw. von außen aufgenommene Stoffe durch die Biotransformationsreaktion soweit zu modifizieren, dass sie an Glucuronsäure, Schwefelsäure oder Aminosäuren gekoppelt und dann über spezifische Transportsysteme in die Galle abgegeben werden können. Die Galle enthält darüber hinaus die Gallensäuren als Endprodukte des Cholesterinabbaus, die eine

essentielle Funktion bei der Verdauung und Resorption in Lipiden im Intestinaltrakt haben.

Besondere Bedeutung unter den Nicht-Parenchymzellen der Leber haben die Sternzellen oder Ito-Zellen. Diese sind imstande, spezifisch Vitamin A und Carotinoide zu speichern, sie synthetisieren außerdem den größten Teil der Bestandteile der extrazellulären Matrix der Leber. Hierzu gehören die Kollagene I, III, IV und VI, sowie verschiedene Proteoglykane, Laminin und Fibronectin. Chronische Schädigungen der Leber führen wahrscheinlich unter Vermittlung spezifischer Zytokine zu einer Umwandlung der Sternzellen in myoepitheliale Zellen, deren Kapazität zur Synthese von Komponenten der extracellulären Matrix wesentlich größer ist. Deswegen sind sie an der Fibrosierung der Leber entscheidend beteiligt, was letzten Endes zum Zustand der Lebercirrhose führt. Eine besondere Bedeutung in diesem Rahmen hat ein hoher Alkoholkonsum.

In die Leber gelangen über die Pfortader die meisten Produkte der Verdauung - Aminosäuren, Monosaccharide, Glycerin und kurzkettige Fettsäuren. Sie werden - je nach Bedarfslage des übrigen Organismus - von den Hepatocyten in andere niedermolekulare Stoffe umgewandelt, zur Biosynthese komplexer Substanzen verwendet, für die Ausscheidung vorbereitet oder auch unverändert in den großen Kreislauf abgegeben bzw. gespeichert. Die Leber sorgt insbesondere für die Kontrolle des Plasmaspiegels vieler Substanzen. Die Leber ist damit das zentrale Organ der Stoffwechselregulation. In keinen anderen somatischen Zellen spielen sich so viele verschiedene Stoffwechselvorgänge ab wie in Hepatocyten. Dies zeigt ein stichwortartiger Überblick:

Aminosäuren werden:	- kontrolliert an das Blut abgegeben, - zu Proteinen der Leber und des Plasmas aufgebaut, - in andere, nicht essentielle Aminosäuren umgewandelt, - desaminiert und das NH_3 wird in Harnstoff eingebaut, - abgebaut zu Acetyl-CoA, Acetacetat oder Dicarbonsäuren.
Glucose wird:	- als Blutzucker kontrolliert ans Blut abgegeben, - zu Glycogen aufgebaut und gespeichert, - über die Glycolyse zur Acetyl-CoA abgebaut, - durch direkte Oxidation in Pentosephosphat überführt.
Fettsäuren werden:	- ans Blut abgegeben, - nach Aktivierung in Leberfette oder Plasmalipoproteine eingebaut, - zu Acetyl-CoA abgebaut.
Cholesterin wird:	- zu Gallensäuren abgebaut und in den Darm ausgeschieden.
Purine werden:	- zu Harnsäure oxidiert.
Aus **Acetyl-CoA** werden:	- Fettsäuren, Ketonkörper oder Steroide synthetisiert, - CO_2 und H_2O bei der Atmung gebildet.
Aus **Oxalacetat** wird:	- Glucose synthetisiert.

Die Leber entnimmt dem Plasma ferner u.a.

Steroide, Bilirubin sowie körperfremde Substanzen, die sie durch Hydroxylierung und anschließende Veresterung wasserlöslich und harnfähig macht ("Entgiftung"); sie produziert dabei auch die für die Verdauung wichtigen Gallensäuren.

Fast alle diese Prozesse sind durch verschiedenste Steuerungsmechanismen (siehe Praktikum III) so untereinander verknüpft, dass der Stoffwechselsituation des Gesamtorganismus in jedem Augenblick Rechnung getragen werden kann.

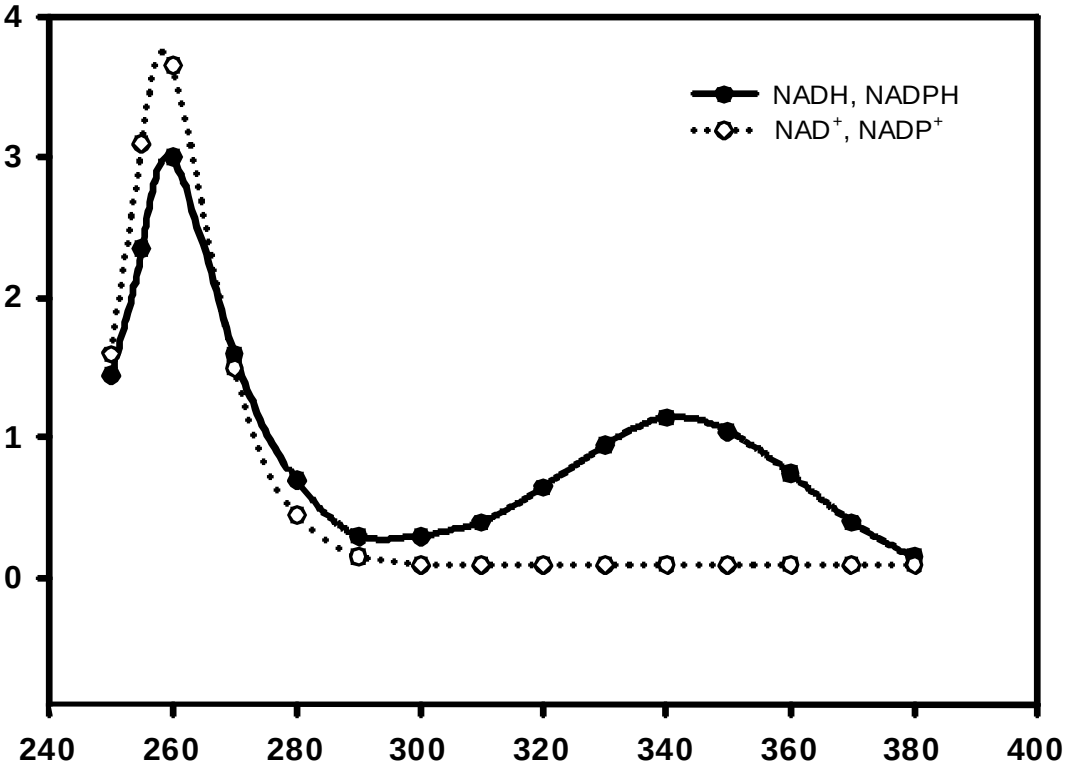
Im Praktikum können nur einige Bereiche des Leberstoffwechsels berücksichtigt werden. Es werden Aufgaben aus dem Aminosäureabbau, dem Purinabbau, dem Hämabbau und der Entgiftungsfunktion sowie eine Cholesterin- und Lipoproteinbestimmung durchgeführt.

Bestimmungen von Enzymaktivitäten im Serum, die von großer klinischer Bedeutung sind (vgl. "Klinischer Anhang"), werden oft mit Hilfe eines sog. "optischen Tests" ausgeführt. Im Folgenden werden die Prinzipien erläutert und ein Beispiel aus dem Aminosäurestoffwechsel gegeben:

Prinzip des optischen Tests

Die Bestimmung der enzymatischen Aktivität mittels des "optischen Tests" beruht darauf, dass die reduzierten Pyridin-Adenin-Dinucleotide (NADH, NADPH) im Gegensatz zu ihren oxidierten Formen (NAD^+, $NADP^+$) Licht absorbieren im Bereich von 300 – 400 nm (Absorptionsmaximum bei 340 nm). Lässt man eine solche Reaktion in der Küvette ablaufen, kann in einfacher Weise durch Messung der Extinktion bei einer geeigneten Wellenlänge (340 nm oder 360 nm) direkt die Oxidation von NADH bzw. Reduktion von NAD^+ verfolgt werden. In der Regel misst man die Extinktion bei der Wellenlänge des Extinktionsmaximums (ε_{max} = 340 nm). Dies ist jedoch keine unbedingte Voraussetzung. Wichtiger ist, dass die Wellenlänge immer genau reproduzierbar ist, und dass es sich um monochromatisches Licht handelt. Genaue Ergebnisse werden deshalb mit Photometern erhalten, bei denen zur Messung isolierte monochromatische Linien (z.B. durch Quecksilberdampf-Lampe + Filter) verwendet werden. Da im Photometer "Eppendorf" bei 340 nm nicht photometriert werden kann, wird mit diesem Gerät die Extinktion bei 366 nm (der nächstgelegenen Emissionsbande des Quecksilbers) bestimmt.

Abbildung 1:



Der molare Extinktionskoeffizient von NADH und NADPH beträgt bei 366 nm

$\varepsilon_{NADH}^{366} = 3{,}3 \bullet 10^3$ [l ·mol^{-1} · cm-$^{-1}$] = 3,3 [cm^2 · µmol^{-1}]

Man benötigt also für den optischen Test in der Regel

1. ein Pyridin-Adenin-Dinucleotid-abhängiges Enzym
2. dessen Substrat
3. Pyridin-Adenin-Dinucleotid (NAD(H); NADP(H)) als Cosubstrat.

Liegt das Gleichgewicht auf der Seite des oxidierten Substrats, so wird die Reaktion mit reduziertem Substrat und oxidiertem Pyridinnucleotid (NAD^+, $NADP^+$) gestartet und die Zunahme an reduziertem Cosubstrat (NADH, NADPH) bestimmt. Wenn dagegen das Gleichgewicht auf der Seite des reduzierten Substrats liegt, startet man die Reaktion mit oxidiertem Substrat und reduziertem Cosubstrat (NADH, NADPH) und bestimmt die Abnahme an reduziertem Pyridinnucleotid.

Viele Enzyme, die nicht direkt mit den Pyridinnukleotiden reagieren, können mit dem optischen Test erfasst werden, indem sie mit einer Pyridinnucleotid-abhängigen Reaktion (Indikatorreaktion) gekoppelt werden. Zwischen Haupt- und Indikatorreaktion

können noch ein bis mehrere Hilfsreaktionen eingeschoben sein. Hierbei muss die Hauptreaktion Geschwindigkeits-bestimmend sein. Die Hilfsreaktion soll mit 100-fach, die Indikatorreaktionen mit 1000-fach höherer Geschwindigkeit ablaufen als die Hauptreaktion.

Ein Beispiel für einen gekoppelten optischen Test wird mit der 1. Aufgabe gegeben.

Weiterführende Literatur

- Das Basiswissen kann anhand aller Lehrbücher der Biochemie und Pathobiochemie erarbeitet bzw. wiederholt werden. Die metabolischen Aufgaben des Organs werden in entsprechenden Kapitel („Leber“) behandelt; Stichworte/Querverweise zu Stoffen, Enzymen, Stoffwechselwegen - im Zusammenhang mit den u.g. Fragen - sind dabei zu beachten.
- Die Pathobiochemie der Leber wird ausführlich im „Löffler/ Petrides, Biochemie und Pathobiochemie, Springer Verlag, behandelt.
- Für einige Fragen /Themen sollten zusätzlich Lehrbücher der Anatomie, Inneren Medizin, Physiologie herangezogen werden.

Weiterführende Fragen

1. Beschreiben Sie: Zelltypen der Leber; intrahepatisches Gefäßsystem; Gallenwege; die anatomisch-biochemische Beziehung Pankreas-Leber.
2. Geben Sie eine Übersicht: Spezifische Stoffwechselleistungen der Leber; anatomische Zonierung der Leber; Zonierung der metabolischen Prozesse.
3. Beschreiben Sie: Verfettung, Fibrose, Zirrhose, Hepatitis, Ascites, portocavale Anastomosen, portaler Hochdruck.
4. Zusammen mit Nr.3: Wie werden Veränderungen bzw. Leberschädigung diagnostiziert? Beschreiben Sie die typischen Enzyme in der Serumdiagnostik.
5. Welche Möglichkeiten hat der Mensch Ethanol abzubauen? “Trinkfestigkeit“; Unverträglichkeit, Acetaldehyd-Syndrom, Leberschädigung, P_{450}-Induktion.
6. Übersicht zu: Blutproteine, die in der Leber (bzw. nicht in der Leber) synthetisiert werden. Akute-Phase-Proteine, α1-Antitrypsin; Abetalipoproteinämie.

7. Beschreiben Sie: alle Gallensäuren/salze; Entstehung, Regulation, Konjugation Enterohepatischer Kreislauf; Zusammensetzung der Leber-& Blasengalle.
8. Zusammen mit Nr. 7: Funktion der Gallensäuren bei der Fettverdauung, Steatorrhö; Cholestatische Lebererkrankungen und Ikterus-Formen.
9. Zusammen mit Nr. 8: Hämabbau, Bilirubinbildung und –ausscheidung, “direktes“, “indirektes“ Bilirubin; UTP; Neugeborenen-Ikterus.
10. Glycogengehalt von Leber und Muskel; Struktur und Eigenschaft des Glycogens; Vergleich zu Energiespeicher Fett; Enzyme für Auf- & Abbau.
11. Zusammen mit Nr.12: Hormonelle Regulation des Glycogenstoffwechsels; Homöostase der Blutglucose; Gluconeogenese, Vorstufen; Hypoglykämie.
12. Zusammen mit Nr. 11: Glycogenosen, Typ I/von Gierke, Typ III; Mangel an Fructose1,6-bisphosphatase; besondere Ernährung.
13. Aufnahme & Verstoffwechselung von Galactose aus der Nahrung. Lactose-intoleranz; erbliche Galactosämie, Folgeerkrankungen, Augenschäden.
14. Aufnahme & Verstoffwechselung von Fructose; essentielle Fructosurie; hereditäre Fructoseintoleranz; Aldolase B; Zusammenhang Sorbitol, Fructose.
15. Endprodukte des Purinabbaus; Wiederverwertung von Basen; Harnsäure, Gicht, Allopurinol; Lesh-Nyhan-Syndrom.
16. Pyrimidinabbau als weitgehend leberspezifische Leistung. Wiederverwertung von Nucleosiden. Übersicht zu Abbaustörungen.
17. Bilanz des Harnstoffzyklus; wozu Arginin? Enzymdefekte & Orotatacidurie.
18. Funktion der Leber für den Kupferhaushalt des Körpers? Vorkommen und Funktion von Kupfer; Wilsonsche Krankheit.
19. Leber und Eisen? Hämosiderose, Hämochromatose, (hepatische) Porphyrien.
20. Unterstützen Sie Nr. 6: Störungen bei Bildung und Export von Lipoproteinen in der Leber; Auswirkungen; Namen der Krankheitsbilder?
21. Prinzip der Biotransformationsreaktionen; beteiligte Enzyme; Beispiele für Endobiotica und Xenobiotica Entsorgung (mit Nr.5).
22. Welche Rolle spielt die Leber: für den Kreatinstoffwechsel? Bei der Calciferol Bildung? Als Vitaminspeicher?
23. Lokalisation und Ablauf der Ketogenese; Ketoacidose; Metabolische Acidose; Rolle der Leber im Säure-Basen-Haushalt.

Aufgabe 1: Bestimmung der Aktivität der Alanin-Amino-Transferase (ALT) im Serum

Die Aminotransferasen, auch als Transaminasen bezeichnet, sind eine Gruppe von Enzymen, die eine reversible Umwandlung von alpha-Ketosäuren in Aminosäuren katalysieren, durch Übertragung einer Amniogruppe. Die diagnostisch wichtigsten Aminotransferasen sind die Alanin-Aminotransferase (ALT) und die Aspartat-Aminotransferase (AST). Die Bestimmung der Serumaktivitäten beider Enzyme wird insbesondere zur Diagnostik, Differenzierung, Verlaufs- und Therapiebeurteilung von Erkrankungen der Leber verwendet.

Prinzip: Das Enzym ALT (EC 2.6.1.2, synonym GPT: Glutamat-Pyruvat-Transaminase) katalysiert die Gleichgewichtsreaktion:

$$\text{L-Alanin} + \alpha\text{-Ketoglutarat} \xrightleftharpoons{\textit{ALT (GPT)}} \text{L-Glutamat} + \text{Pyruvat}$$

Coenzym ist Pyridoxalphosphat.

Man bestimmt die Aktivität der ALT aus der Geschwindigkeit der durch diese Reaktion hervorgerufenen Pyruvat-Zunahme. Das entstehende Pyruvat wird in der gekoppelten, durch Lactatdehydrogenase (LDH) (EC 1.1.1.27) katalysierten Indikator-Reaktion bestimmt:

$$\text{Pyruvat} + \text{NADH} + \text{H}^+ \xrightleftharpoons{\text{LDH}} \text{Lactat} + \text{NAD}^+$$

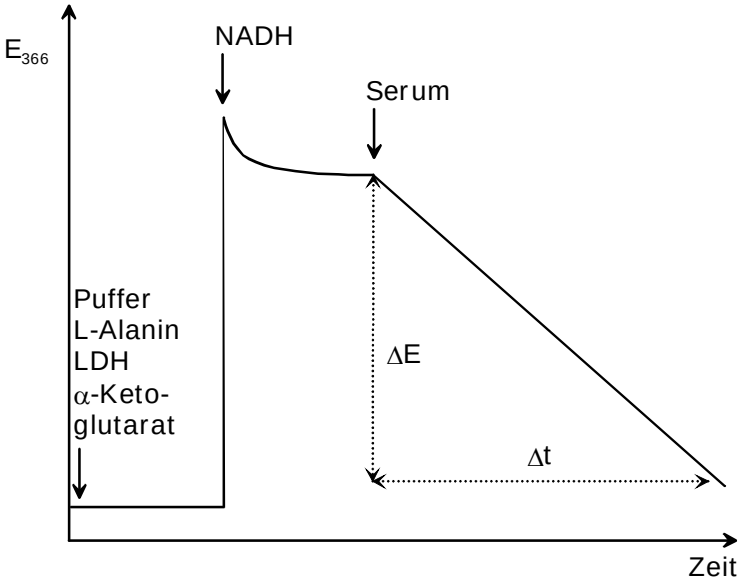


Abbildung 2: Schema des optischen Tests mit Indikator-Reaktion (ALT-Bestimmung)

Da das Gleichgewicht weit auf der rechten Seite liegt, wird jedes aus Alanin gebildete Mol Pyruvat durch LDH zu Lactat reduziert. Dabei wird 1 Mol NADH zu NAD^+ oxidiert. Damit wird der Extinktionsabfall pro min direkt der Geschwindigkeit der Transaminierungs-Reaktion proportional. Die Reaktionsfolge ist in Abb. 2 dargestellt.

Ausführung: ("Biochemica-Test-Combination ALT")

In ein Reagenzglas wird folgende Lösung pipettiert:

1. 600 µl Puffer/Alanin
   (Konzentration der Reagenzlösung Phosphat-Puffer: 93 mmol/l, pH 7,4; L-Alanin: 933 mmol/l; LDH ≥ 1,4 U/ml; NADH: 0,21 mmol/l; α-Ketoglutarat : 21 mmol/l)
2. Man lässt sie für 5 min bei 25°C im Wasserbad stehen und gießt in eine 1 cm Halbmikroküvette um.
3. Man startet die Reaktion mit 100 µl Hämolyse-freiem Serum (gründlich mischen!) und liest die Extinktion in 1-min Abständen (5 Werte) bei 366 nm ab.
4. Aus den Messwerten wird die Anfangsgeschwindigkeit der Reaktion durch graphische Darstellung ermittelt. Das eingesetzte Serum ist mit physiologischer Kochsalzlösung zu verdünnen, wenn Δ E/min > 0,080 wird.

Bemerkungen:

Ähnliche Systeme werden zur Bestimmung der Aspartat-Amino-Transferase (AST, synonym GOT), der Aldolase und der Pyruvat-Kinase verwendet. Je nach Gestaltung der Versuchsanordnung können auch Alanin und α-Ketoglutarat mit diesem Test bestimmt werden.

Aufgabe 2: Bestimmung der Harnstoffkonzentration im Harn mit Urease

Harnstoff ist das Endprodukt des Eiweiß- und Aminosäurestoffwechsels und wird in der Leber gebildet. Beim Eiweißabbau werden die Proteine in Aminosäuren zerlegt und desaminiert. Der dabei anfallende Ammoniak wird in den Mitochrondrien über den Harnstoffzyklus in Harnstoff umgewandelt.

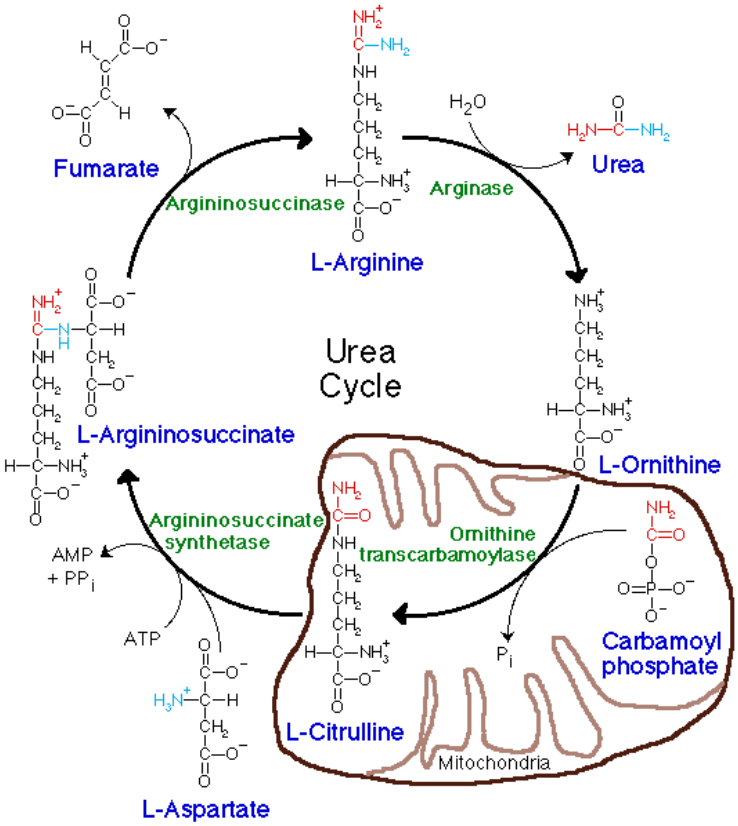


Abbildung 3: Schematische Darstellung wichtiger Reaktionen im Harnstoffzyklus

Im Mittel enthält das Nahrungsprotein 16% Stickstoff. Von diesem werden 90% nicht für metabolische Prozesse benötigt sondern in Harnstoff umgewandelt. Es werden etwa 16g Harnstoff täglich von Erwachsenen gebildet.

Die Harnstoffelimination erfolgt überwiegend renal durch glomuläre Filtration. Im wesentlichen wird der Harnstoffwert durch die renale Perfusion und Filtration und die Harnstoffbildungsrate (z.B. abhängig von der täglichen Eiweißzufuhr) bestimmt.

Indikation:

- Differenzierung der prärenalen von der postrenalen Azotämie (erhöhter Harnstoffwert) anhand des Harnstoff/Creatinin-Quotienten
- Bei terminaler Niereninsuffizienz
- Bei Dialysepatienten, da die Harnstoffkonzentration representativ für den Proteineinabbau ist und einen Hinweis auf den metabolischen Status gibt

Prinzip:

Harnstoff wird in einer durch Urease katalysierten enzymatischen Reaktion in Ammoniak und Kohlendioxid gespalten, die im wässrigen Milieu zu Ammoniumcarbonat reagieren.

$$\text{Harnstoff} + 2\ H_2O \xrightarrow{\text{Urease}} 2\ NH_4^+ + CO_3^{2-}$$

Die Ammoniumionen reagieren mit Salicylat und Hypochlorid unter Bildung eines roten Farbstoffs, dessen Farbintensität der Harnstoffkonzentration proportional ist.
Da die Reaktion empfindlich gegenüber Ammoniumsalzen ist, stets mit sauberen Glasgeräten arbeiten!

Lösungen:

1. Harn (1:100 verdünnen mit Aqua dest.!!!)
2. Färbereagenz
3. Standard: Harnstoff: 8,3 mmol/l

Ausführung:

Auf den Boden von 3 Reagenzgläsern in folgender Reihenfolge pipettieren:

Markierung der Reagenzgläser	**Leerwert**	**Standard**	**Probe**
verdünnter Harn	--	--	10 µl
H_2O	10 µl		--
Standard	--	10 µl	--
Färbereagenz 1	1 ml	1 ml	1 ml
Urease	10µl	10µl	10µl

Nach 5 min. bei 37° C Färbereagenz 2 (1ml) dazugeben.

Nach weiteren 5 min bei 37° C messen bei 578 nm.

Aufgabe 3: Aktivitätsbestimmung von Xanthinoxidase und Uricase. Allopurinolwirkung

Biochemische Grundlagen und Prinzip:

Xanthinoxidase (XOD) katalysiert zwei aufeinander folgende Reaktionsschritte des Purinabbaus (Fig. 3). XOD ist eine Oxidoreduktase mit hohem MG (300 000 Dalton) und einer komplizierten prosthetischen Gruppe, die 2 Mol FAD, 8 Mol "nicht Häm-Eisen" und 1 Mol Molybdän pro Mol Enzym enthält. XOD wird vor allem aus Leber und aus Milch gewonnen. Ihre Substratspezifität ist relativ gering; z.B. werden viele Aldehyde und viele Purinanaloge oder Purinderivate oxidiert. Das mit Hypoxanthin isomere Allopurinol wird anstelle von Hypoxanthin an XOD gebunden, langsam zu Alloxanthin oxidiert, dieses jedoch nicht weiter zu Harnsäure. Allopurinol ist daher kompetitiver Inhibitor für die Reaktionen I und II; die Hemmung der Reaktion II stellt eine "dead end inhibition" dar.

Harnsäure ist bei Primaten das Endprodukt des Purinabbaus. Bei den anderen Säugern wird sie durch Uricase (Urat-Oxidase) zu Allantoin abgebaut. Uricase ist ein Cuproproteid (1 Mol Cu pro Mol Enzym) mit sehr hoher Substratspezifität; Hemmstoffe sind Cyanid und 2,6,8-tri-substituierte Purine.
Die drei Oxopurine besitzen unterschiedliche Absorptionsspektren im fernen UV-Bereich (Fig. 4 zeigt die Spektren von Xanthin und Harnsäure). Die Extinktion einer Xanthinlösung bei 293 nm steigt durch Oxidation in Gegenwart von XOD an, verschwindet dagegen bei Abbau der Harnsäure durch Uricase. Daher können beide Reaktionen durch "optische Tests" in der Küvette verfolgt werden.

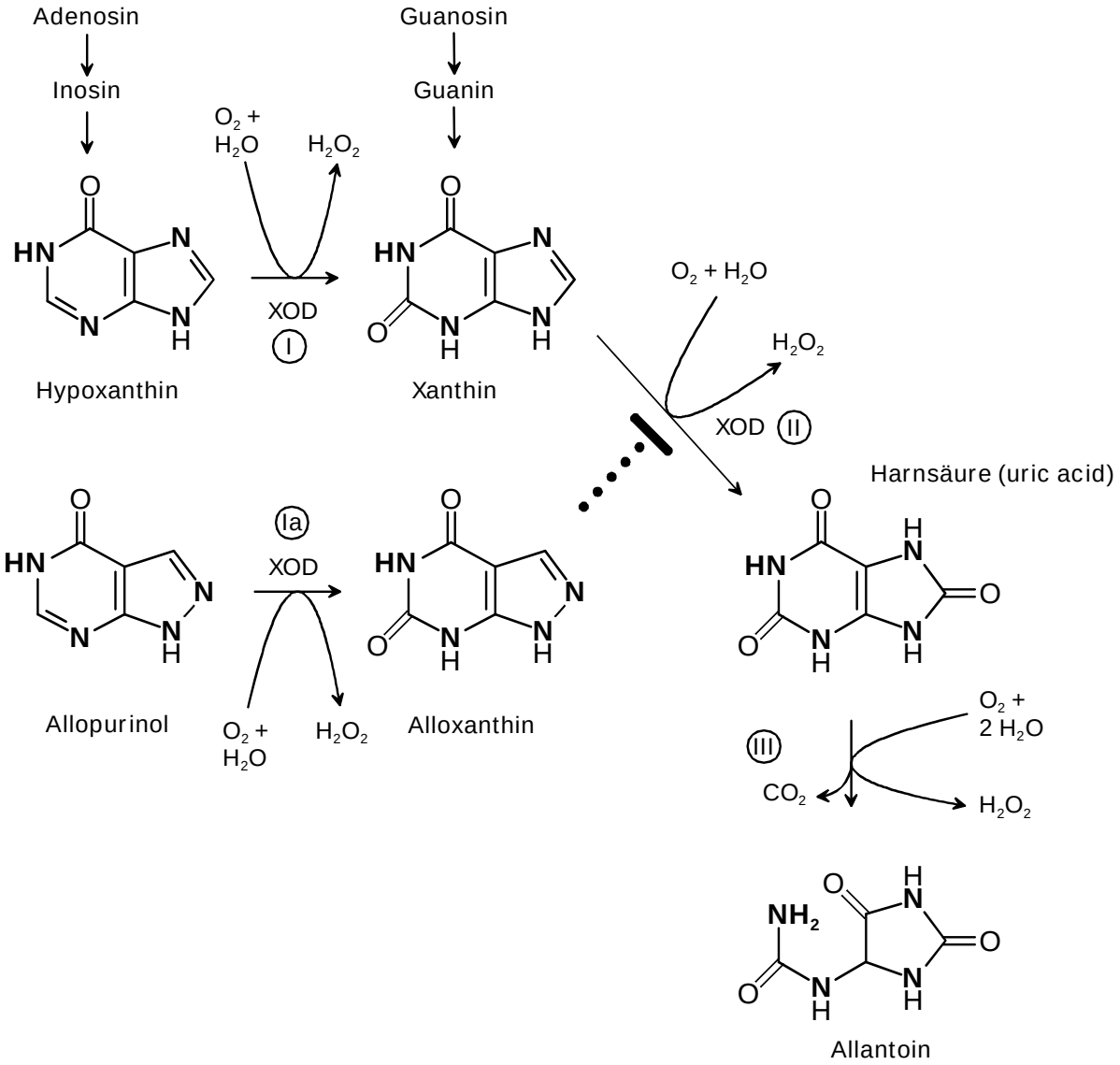


Abbildung 4:

Uratbildung aus Hypoxanthin.

Allopurinolwirkung. Uratabbau (Säugerleber); bei Primaten fehlt Reaktion III.

Ausstehende Lösungen:

1. $4 \cdot 10^{-5}$ M Xanthinlösung in 0,06 M Glycylglycinpuffer, pH 8,2
2. $8 \cdot 10^{-4}$ M Allopurinollösung
3. Xanthinoxidase-Lösung in 0,2 M Natriumphosphatpuffer, pH 7,4
4. Uricase-Lösung

Ausführung:

a) 3 ml Xanthinlösung (1) in Küvette geben.

b) Extinktionswert bei 293 nm mit Verstärkungsregelung auf E = O einstellen.

c) 20 µl XOD-Lösung (3) in Küvette pipettieren. **Im gleichen Moment** Stoppuhr starten und Küvetteninhalt mit Plastikspatel kurz, aber gründlich mischen.

d) Nach 30 s und anschließend jede halbe Minute bis zur 4. Minute die Extinktion (293 nm) notieren.

e) Sofort nach Ablesung des 4-Minuten-Wertes 20 µl Allopurinollösung (2) in die Küvette geben, gut mischen und weiterhin jede halbe Minute ablesen, bis die Extinktion nicht mehr steigt.

f) Wenn die Extinktion nicht weiter ansteigt, 20 µl Uricase zugeben, mischen, Uhr starten und jede Minute Extinktion ablesen und notieren.

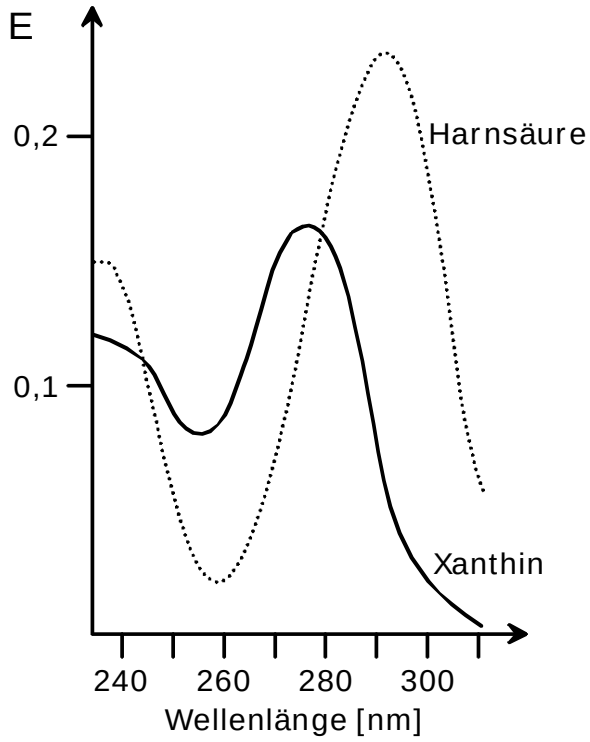


Abbildung 5:

UV-Spektren von Xanthin (———) und Harnsäure (----------)

Klinische Bedeutung der Oxopurine

Normalwerte:

	Serum	Harn
Harnsäure	2,5 - 7,0 mg/100 ml	250 - 750 mg/Tag
Xanthin + Hypoxanthin	0,1 - 0,3 mg/100 ml	5 - 15 mg/Tag

Harnsäure kann in wässriger Lösung max. 2 Protonen abdissoziieren (pK_1 = 5,75, pK_2 = 10,3). Während Diurate (pH > 10,3) leicht löslich sind, lösen sich Harnsäure und Monourate schlecht in Wasser (ca. 6 mg/100 ml). Daher ist der Harn stets, das Serum ab ca. 6 mg/100 ml an Harnsäure übersättigt. Erhöhte Harnsäurewerte im Serum führen zur Kristallisation von Monourat in mucopolysaccharid- und kollagenreichen Geweben (z.B. Gelenken), erhöhte Urinwerte oder vermehrte Kristallisationskeime (abgeschilferte Epithelien, Bakterien) zur Harnsteinbildung. Xanthin ist schlechter, Hypoxanthin jedoch 30-mal besser wasserlöslich als Harnsäure. Erhöhung der Harnsäurekonzentration im Serum, Hyperuricämie, kommt vor bei Niereninsuffizienz (Urämie, zugleich Erhöhung des Harnstoffs im Serum), bei vermehrtem Nukleinsäureumsatz (Leukämie, Polycythämie) und vor allem bei den Stoffwechselerkrankungen Gicht und kongenitale Hyperuricämie (Lesch-Nyhan). Bei letzterer Erkrankung liegt ein Defekt der Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase vor, die die Resynthese von Inosin- und Guanosinmonophosphat aus den im Abbau anfallenden freien Basen katalysiert; daher sind die Purinsynthese *de novo* und damit auch der Purinabbau mit Harnsäurebildung gesteigert. Ursache der Gicht kann sowohl Purin-Synthesesteigerung (durch Regulationsdefekt) als auch eine verminderte tubuläre Ausscheidung von Harnsäure sein. Der XOD-Hemmer Allopurinol ist das wichtigste Therapeuticum gegen Hyperuricämien: Bei vielen Gichtkranken wird die Purinsynthese und damit die Purinausscheidung normalisiert; bei kongenitaler Hyperuricämie steigt die Xanthinausscheidung um einen äquivalenten Betrag an, nicht jedoch der Blut-Xanthinspiegel, da Xanthin von der Niere wesentlich rascher ausgeschieden wird als Harnsäure. Bei Xanthinurie fehlt XOD in der Leber, anstelle von Uraten werden Hypoxanthin und Xanthin ausgeschieden; es kommt zur Bildung von Xanthinkonkrementen in den Harnwegen.

Abbau von Hämoproteiden; Gallenfarbstoffe

Der Abbau des Porphyrinringes geht von der eisenhaltigen Form aus. Der Hämoglobinabbau besitzt in allen Phasen hohe klinische und medizinisch-diagnostische Bedeutung für die Art des Ikterus (Gelbsucht), s. Abb. 6

Ad I: Prähepatische Phase:
Von der Globinabspaltung erfolgt Oxidation zu Methämoglobin. Spezifisches Substrat der mikrosomalen, mischfunktionellen Oxigenase ist Hämatin, welches an das Protein Hämopexin (oder an Albumin) gebunden ist. Die α-Methinbrücke (zwischen Ring I und II) wird als Kohlenmonoxyd eliminiert.

Ad II: Die intrahepatische Phase zerfällt in 3 Abschnitte:

II a) Einschleusung von Bilirubin in die Leberparenchymzellen und Transport zu den Mikrosomen. Wahrscheinlich existieren 2 verschiedene Transportproteine, x und y.

II b) Konjugation mit Glucuronsäure. Es entsteht hauptsächlich Bilirubin-Diglucuronid neben wenig Monoglucuronid.

II c) Exkretion des wasserlöslichen Bilirubin-Diglucuronids in die Gallenkanälchen.

Ad III: Posthepatische Phase:
Die Abspaltung der Glucuronsäure von den Gallenfarbstoffen und die weitere Reduktion findet im Ileum und Colon durch bakterielle Enzyme statt; die Reoxidation der farblosen Endprodukte Uro- bzw. Stercobilinogen zu den gefärbten Stoffen Uro- bzw. Stercobilin geschieht spontan durch Luftsauerstoff.

Stercobilinogen wird aus dem unteren Colon direkt in den großen Kreislauf aufgenommen und gelangt ständig in geringer Menge in den Harn; daher ist die Reaktion von Harn mit Ehrlich's Reagenz (4-Dimethylamino-benzaldehyd) normalerweise in der Wärme schwach positiv.
Ein Teil des Urobilinogens und Stercobilinogens - nicht des Bilirubins - wird aus dem Ileum rückresorbiert und durch die V. portae zur Leber geführt "enterohepatischer Kreislauf"). Bei Leberparenchymerkrankungen oder Veränderungen der Leberdurchblutung (besonders Rechtsinsuffizienz des Herzens mit "Stauungsleber") ist die

Reabsorption von Urobilinogen durch die Leber mangelhaft: Urobilinogen im Harn wird stark erhöht gefunden. Wegen der Autoxidation ist eine positive Ehrlich'sche Reaktion nur zu erwarten, wenn der Harn nicht zu alt ist. Eine Differenzierung zwischen der Rotfärbung durch Uro- bzw. Stercobilinogen und der durch Porphobilinogen ist durch Ausschütteln der Farbe mit Chloroform möglich: Dies gelingt nicht bei dem stärker polaren Phorphobilinogen-Aldehyd-Kondensationsprodukt.

Störungen im Hämoglobinabbau

Alle praktisch bedeutsamen Störungen des Hämoglobinabbaus führen zur Erhöhung des Serumbilirubinspiegels. Krankheitserscheinungen und Prognosen sind unterschiedlich, je nachdem, ob ausschließlich oder vorwiegend unkonjugiertes oder konjugiertes Bilirubin vermehrt ist. Für die Differentialdiagnose der ikterischen Erkrankungen sind daher die klinisch-chemischen Befunde (Blut, Urin, Faeces) wichtig.

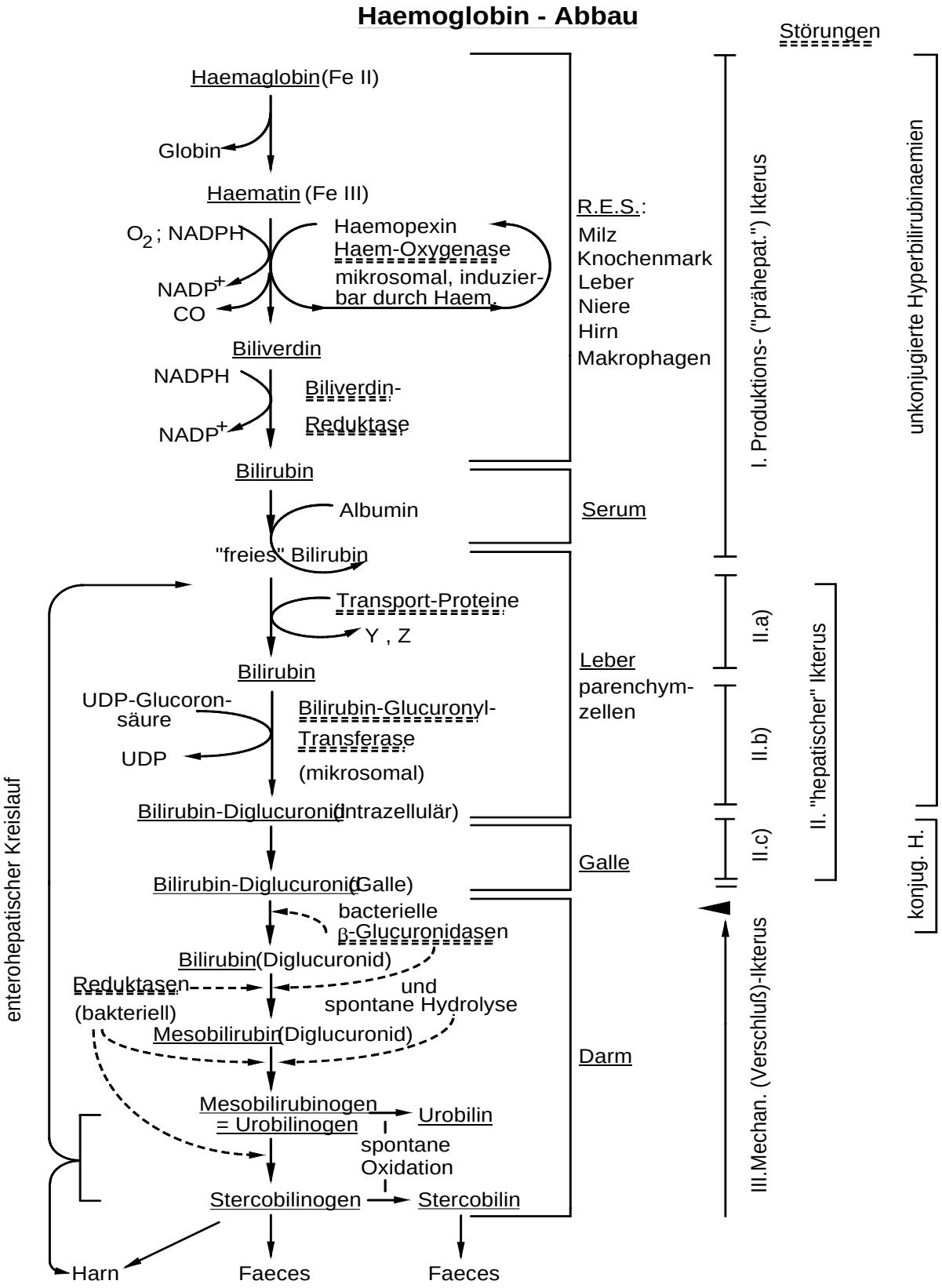


Abbildung 6: Übersicht über den Hämoglobinabbau

Aufgabe 4: Bestimmung des Gesamt-Bilirubins und des konjugierten ("direkten") Bilirubins im Serum mit der Diazoreaktion nach Jendrassik-Gróf

Prinzip:

1. Bildung von Diazonium-Chlorid: Sulfanilsäure bildet mit $NaNO_2$ in stark salzsaurer Lösung Diazonium-Chlorid. Dieser Stoff ist unbeständig und muss daher jeweils frisch hergestellt werden (Abb.6a).

2. Nachdem Sulfanilsäure mit Natriumnitrit diazotiert wurde, reagiert sie mit Bilirubin zu einem **Azofarbstoff** (in neutraler Lsg.:rot, in alkalischer: blau) (Fig. 6b)
   - Direktes Bilirubin reagiert direkt mit diazotierter Sulfanilsäure; Die Bestimmung des "direkten" Bilirubin erfasst nur das wasserlösliche Diglucuronid: Nach Aufbrechen der mittleren (α-)-Methinbrücke reagiert der eine Dipyrrolrest direkt mit Diazonium-Chlorid, der zweite nach Umlagerung; es entstehen isomere Azofarbstoffe.

   - an Albumin gebundenes Bilirubin reagiert erst in Anwesenheit von Coffein (= Accelerator = Katalysator). Zur Bestimmung des Gesamtbilirubins muss das wasserunlösliche Pigment deshalb durch Zusatz von Akzeleratoren (Methanol, Benzoat, Coffein oder Diphyllin) aus der Eiweißbindung freigesetzt werden, bevor sich Azo-Farbstoffe bilden können, wie unter a) beschrieben.

Abbildung 7a:

Diazotierung:

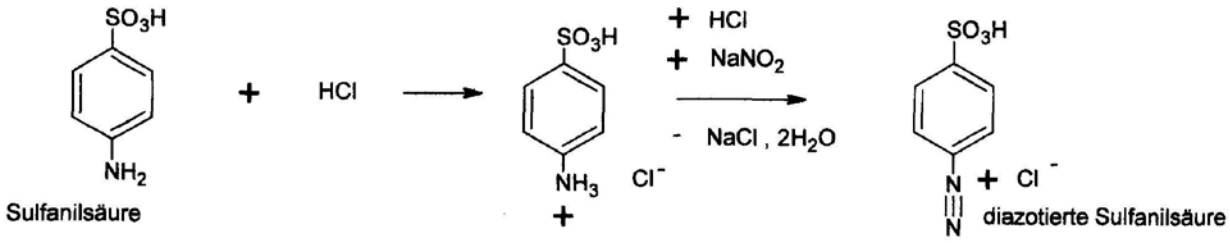
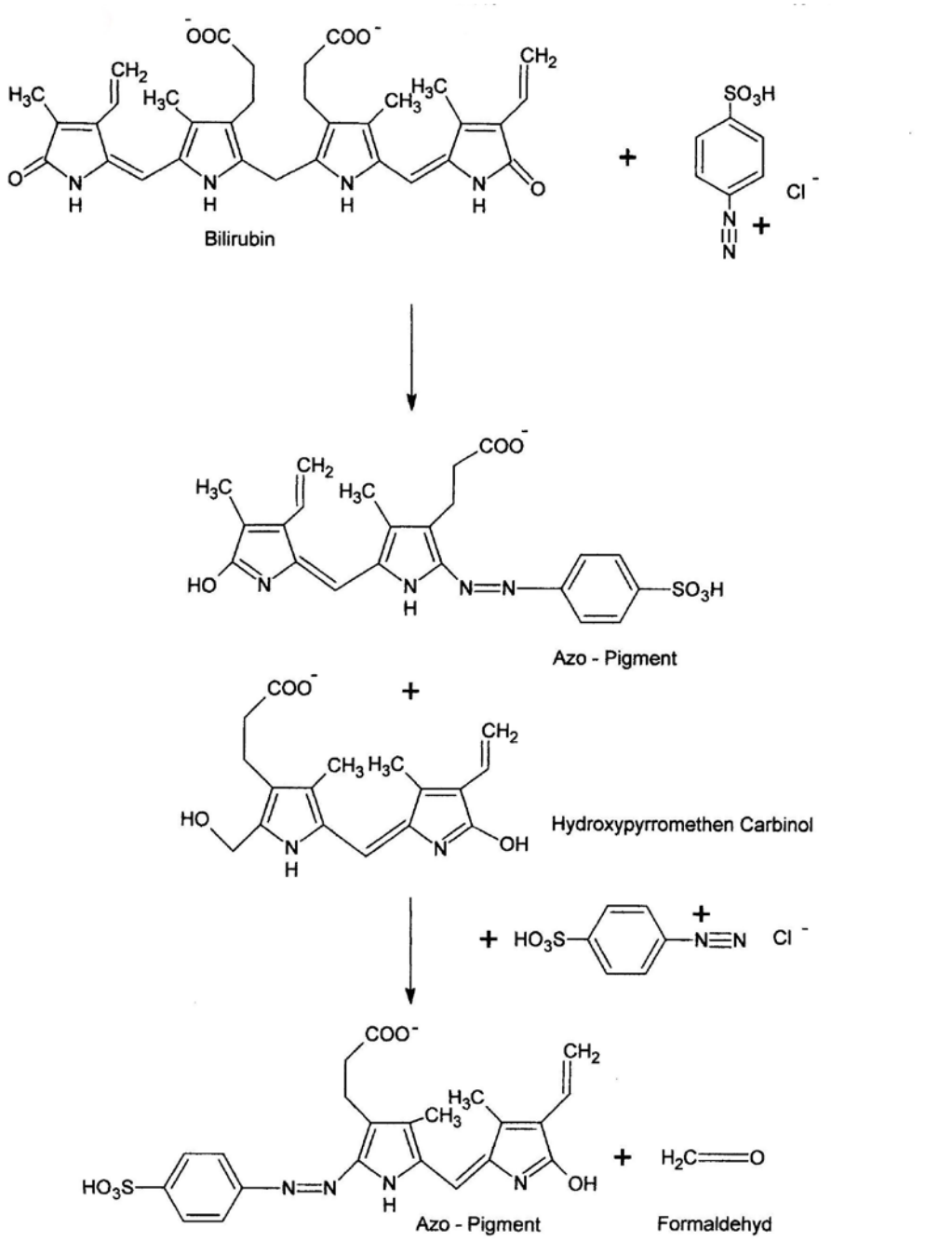


Abbildung 7b: Entstehung von Azo-Farbstoffen



Reagenzien:

(1) 29 mM Sulfanilsäure, 0,17 M Salzsäure

(2) 29 mM Natriumnitrit

(3) 130 mM Coffein
260 mM Natriumbenzoat (Akzelerator)

(4) 930 mM M Kalium-Natrium-Tartrat, 1,9 M Natronlauge

(5) Bilirubin-Standardlösung (10 mg/100 ml)

(6) Natriumchlorid-Lösung 0,9%ig

Ausführung: Man pipettiert nacheinander in 5 Reagenzgläser: [alle Werte in ml]

	Gesamt-Bilirubin	**Standard**	**Leerwert 1**	**direktes Bilirubin**	**Leerwert 2**
Sulfanilsäure (1)	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20
Natriumnitrit (2)	0,02	0,02	-	0,02	-
Accelerator (3)	1,00	1,00	1,00	-	-
Serum	0,20	-	0,20	0,20	0,20
Standard (5)	-	0,20	-	-	-
NaCl (6)	-	-	-	2,00	2,00
	gut mischen; 10- 60 min bei Raumtemperatur stehen lassen			Nach genau 5 min (Stoppuhr) den Ansatz für direktes Bilirubin gegen den Leerwert 2 bei **546 nm**[1] im Eppendorf-Photometer messen	
Tartrat/NaOH (4)	1,00	1,00	1,00		
	gut durchmischen; nach 10 min den Ansatz für Gesamt-Bilirubin und den Standard gegen den Leerwert 1 bei **578 nm**[1] im Eppendorf-Photometer messen.				

Normalwerte: Gesamt-Bilirubin bis 1,0 mg/100 ml,
direktes Bilirubin bis 0,25 mg/100 ml.

[3] Die Formel ist gültig, da die Extinktionskoeffizienten der Farbkomplexe bei der jeweiligen Wellenlänge ungefähr gleich sind.

Aufgabe 5: Bestimmung des Gesamtcholesterins, des HDL-Cholesterins und des LDL-Cholesterins im Serum

Cholesterin

Die Leber wandelt Cholesterin in seine Ausscheidungsform - die Cholsäure - um, die über die Gallengänge in den Darm ausgeschieden wird. Da die Leber das Cholesterin den Lipoproteinen des Serums, hauptsächlich LDL und HDL, entnimmt, ist sie auch für die Regulation des Cholesterinspiegels im Serum wesentlich mitverantwortlich.

Cholesterin ist ein essentieller Bestandteil von Zellmembranen. Darüberhinaus ist es Vorstufe von Steroidhormomen, Gallensäuren und Vitamin D. In Zellmembranen beeinflußt es die Fluidität der Membranen, deren Regulation für ein Überleben der Zelle unverzichtbar ist. Um den Cholesterinstoffwechsel verstehen zu können, muss man die Funktion von Lipoproteinen kennen. Es gibt vier verschiedene Lipoproteine, die Chylomikronen, die VLDL, die LDL und die HDL (high density Lipoproteine). Chylomikronen werden in den Mucosazellen des Darms gebildet. Sie geben zunächst über die Lipoproteinlipase Triglyceride an die extrahepatischen Gewebe (vor allem Fettgewebe und Muskel) ab und transportieren anschließend als Chylomikronenremnants die übriggebliebenen Lipide, insbesondere Cholesterin und Cholesterinester, in die Leber. VLDL transportieren Lipide aus der Leber in andere Organe. Dabei geben sie ebenfalls ihren Triglyceridanteil mit Hilfe der Lipoproteinlipase an die extrahepatischen Gewebe ab und verwandeln sich anschließend im Blut in LDL, die vor allem Cholesterinester transportieren. Über den LDL-Rezeptor gelangen die LDL in jede Körperzelle. Das von den Zellen aufgenommene Cholesterin kann in die Zellmembranen eingebaut werden. Unabhängig von der Versorgung mit Cholesterin über die LDL kann Cholesterin vom Organismus auch selbst synthetisiert werden. Cholesterin ist nicht essentiell! HDL transportiert das Cholesterin aus diesen Zellen zurück in die Leber. Dazu verestert es das Cholesterin mit Hilfe der Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase. Das in die Leber gelangte Cholesterin wird zu Gallensäuren umgewandelt und so ausgeschieden. Cholesterin ist in den Lipoproteinen des Blutserums zu ca. 2/3 als Fettsäureester und zu ca. 1/3 in freier (unveresterter) Form vorhanden. Der überwiegende Teil des

gesamten Serumcholesterins wird in den Lipoproteinen geringer Dichte (LDL) und in den Lipoproteinen hoher Dichte (HDL) transportiert, der Anteil von Cholesterin in den Chylomikronen und VLDL ist gering.

Medizinische Bedeutung

Erhöhte Cholesterinwerte im Serum findet man bei primärer und sekundärer Hyperlipoproteinämie. Es gibt eine Reihe genetisch und nicht genetisch bedingter Hypercholesterinämien, die hier nicht im einzelnen dargelegt werden können. Eine Erhöhung des Gesamtcholesterins im Serum (s. Tabelle 1) ist ein primärer Risikofaktor einer Atherosklerose bzw. einer koronaren Herzkrankheit. Neuere Untersuchungen zeigen jedoch, daß die atherogene Bedeutung des Gesamtcholesterins differenziert gesehen werden muss. Aufgrund zahlreicher epidemiologischer und klinischer Studien werden die LDL, die ca. 70% des Gesamtcholesterins transportieren, als die wichtigsten atherogenen Lipoproteine angesehen. Ihre Erhöhung bedeutet ein besonders hohes Risiko.
Im Gegensatz zu den LDL stellt eine Erhöhung der zweiten Cholesterin-reichen Klasse der Lipoproteine - der HDL - jedoch kein Risiko dar. Im Gegenteil wurde festgestellt, dass zwischen koronarer Herzkrankheit und HDL - bzw. der HDL-Cholesterin-Konzentration - eine inverse Beziehung besteht. Das bedeutet, daß einer erhöhten HDL-Konzentration eine Schutzwirkung gegenüber der Entstehung einer Atherosklerose zugeschrieben wird. Die Schutzwirkung der HDL beruht auf ihrer Fähigkeit, Cholesterin von den peripheren Zellen in die Leber zu transportieren. Einschließlich der Zellen des Blutgefäßsystems vermindern sie somit den Cholesteringehalt. Das von den HDL in die Leber transportierte Cholesterin wird dort zum Teil in Gallensäure umgewandelt und in den Intestinaltrakt ausgeschieden.

Tabelle 1

	Nicht behandlungsbedürftig	Behandlungsbedürftig
LIPID	**Konzentration (mg/dl)**	
Gesamtcholesterin	**< 200**	**> 300**
Triglyceride	**< 200**	**> 200** [1)]
HDL-Cholesterin	**> 35**	**< 35** [2)]
LDL-Cholesterin	**< 190**	**> 190**

[1)] wenn HDL-Cholesterin < 35 mg/dl

[2)] wenn Gesamtcholesterin und/oder Triglyceride > 200 mg/dl

Versuchsprinzip

Zur Bestimmung des Gesamtcholesterins im Serum müssen die in den Lipoproteinen vorhandenen Cholesterinfettsäureester durch Cholesterin-Esterase in nichtverestertes Cholesterin und freie Fettsäuren hydrolysiert werden (1). In einer enzymatischen Reaktion wird das freie Cholesterin durch Luftsauerstoff unter Mitwirkung von Cholesterin-Oxidase zu Δ^4-Cholestenon und Wasserstoffperoxid oxidiert (2). Das entstandene Wasserstoffperoxid bildet mit den Farbreagenzien 4-Aminophenazon und Phenol unter katalytischer Wirkung der Peroxidase den roten Farbstoff 4-(p-Benzochinonmono- imino)-phenazon (3), dessen Farbintensität der Cholesterinkonzentration proportional ist. Die Auswertung erfolgt über einen vom Hersteller für die jeweiligen Bedingungen ermittelten Faktor (s. Auswertung).

(1) Cholesterin-Esterase-Reaktion:

$$\text{Cholesterinester} + H_2O \rightleftharpoons \text{Cholesterin} + \text{Fettsäuren}$$

(2) Cholesterin-Oxidase-Reaktion:

$$\text{Cholesterin} + O_2 \rightleftharpoons \Delta^4\text{-Cholestenon} + H_2O_2$$

(3) Peroxidase-Reaktion:

$$H_2O_2 + \text{Farbreagenz} \rightleftharpoons \text{Farbstoff} + 2\ H_2O$$

Zur Bestimmung des HDL-Cholesterins wird das zu untersuchende Serum mit Phosphowolframsäure und Magnesiumchlorid versetzt. Dadurch werden die Chylomikronen, VLDL und LDL präzipitiert. Nach Zentrifugation verbleiben im Überstand überwiegend die HDL, deren Cholesterinkonzentration enzymatisch - in Analogie zur Bestimmung des Gesamtcholesterins- bestimmt wird.
Zur Bestimmung des LDL-Cholesterins werden die Lipoproteine geringer Dichte (LDL) aus dem Serum gefällt. Aus der Differenz der Cholesterinwerte im Serum (Gesamtcholesterin) und im Präzipitationsüberstand läßt sich die Konzentration des LDL-Cholesterins errechnen.

Versuchsdurchführung

Bestimmung des Gesamtcholesterins

Das Cholesterin-Reagenz wird auch zur Bestimmung des HDL-Cholesterins und des LDL-Cholesterins verwendet.

In entsprechend beschriftete Reagenzgläser mit 1 cm Innendurchmesser wird nach folgendem Schema pipettiert:

	Reagenzien-Leerwert	Probe
Aqua dest.	20 µl	-
Serum	-	20 µl
Cholesterin-Reagenz	1000 µl	1000 µl

Nach Mischen werden Reagenzien-Leerwert und Probe 10 min bei 20-25°C (Raumtemperatur) inkubiert. Nach der Inkubation werden die Ansätze durch Zugabe von 1000 µl Wasser verdünnt. Der entstehende Farbstoff ist ca. 1 h lang stabil; innerhalb dieser Zeit wird die Extinktion der Probe gegen den Reagenzien-Leerwert bei einer Wellenlänge von 546 nm bei 1 cm Schichtdicke gemessen.

Reagenzien

Cholesterin-Reagenz (Konzentrationen in der gebrauchsfertigen Lösung):
PIPES-Puffer: 75 mM Piperazin-1,4-bis(2-ethansulfonsäure), pH 6,8; Mg^{2+} 10 mM; 4-Aminophenazon >0,15 mM; Natriumcholat 0,2 mM; Phenol ≥ 4,2 mM; Fettalkoholpolyglykolether 1%; Cholesterinesterase (Pseudomonas spec.) ≥ 0,5 U/ml; Cholesterinoxidase (E.coli) ≥ 0,15 U/ml; Peroxidase (Meerrettich) ≥ 0,25 U/ml; Stabilisatoren und Konservierungsmittel

Auswertung

Bestimmen Sie die Konzentration des Cholesterins in der Probe in mg/dl und mmol/l:

C_{Chol} (mg/dl) = **852,8** · E_{Probe} (546 nm)
C_{Chol} (mmol/l) = **22,06** · E_{Probe} (546 nm)

Bestimmung des HDL-Cholesterins

In ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäße werden 40 µl Serum und 100 µl Fällungsreagenz (HDL-C) gegeben. Nach Mischen läßt man 10 min bei Raumtemperatur stehen und zentrifugiert dann 2 min bei 10.000·g. Nach Zentrifugation wird der klare Überstand innerhalb von 2 h vom Rückstand abgetrennt und für die HDL-Cholesterinbestimmung mit dem Cholesterin-Reagenz (s. Bestimmung des Gesamt-cholesterins) eingesetzt.

Dazu wird in entsprechend beschriftete Reagenzgläser mit 1 cm Innendurchmesser nach folgendem Schema einpippetiert:

	Reagenzien-Leerwert	Probe
Aqua dest.	100 µl	-
Überstand	-	100 µl
Cholesterin-Reagenz	1000 µl	1000 µl

Nach Mischen werden Reagenzien-Leerwert und Probe 10 min bei 20-25°C (Raumtemperatur) inkubiert. Nach der Inkubation werden die Ansätze durch Zugabe von 1000 µl Wasser verdünnt. Innerhalb 1 h wird die Extinktion der Probe (E_{Probe}) bei 546 nm gegen den Reagenzien-Leerwert wie bei der Bestimmung des Gesamtcholesterins gemessen.

Reagenzien:

1. *Cholesterin-Reagenz (s. Bestimmung des Gesamtcholesterins)*
2. *Reagenz zur Fällung der Nicht-HDL-Lipoproteine (0,44 mM Phosphowolframsäure, 20 mM Magnesiumchlorid).*

<u>Auswertung</u>

Bestimmen Sie die Konzentration des HDL-Cholesterins in der Probe in mg/dl und mmol/l:

C_{Chol} (mg/dl) = **650,2** · E_{Probe} (546 nm)

C_{Chol} (mmol/l) = **16,82** · E_{Probe} (546 nm)

Bestimmung des LDL-Cholesterins

In ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß werden 20 µl Serum und 100 µl Fällungsreagenz (LDL-C) pipettiert. Nach Mischen werden die Ansätze 15 min bei 20-25°C inkubiert und anschließend bei 10.000 g für 2 min zentrifugiert. Nach Zentrifugieren wird der Überstand vom Rückstand getrennt und für die Cholesterin-Bestimmung (s. Bestimmung des Gesamtcholesterins) eingesetzt. Nach 10 minütiger Inkubation mit dem Cholesterinreagenz wird der Ansatz durch Zugabe von 1000 µl Wasser verdünnt und wie oben beschrieben gegen den Leerwert gemessen.

Dazu wird in entsprechend beschriftete Reagenzgläser nach folgendem Schema einpippetiert:

	Reagenzien-Leerwert	Probe
Aqua dest.	100 µl	-
Überstand	-	100 µl
Cholesterin-Reagenz	1000 µl	1000 µl

Reagenzien

1. *Cholesterin-Reagenz (s.Bestimmung des Gesamtcholesterins)*
2. *Fällungsreagenz (0,68 g/l Heparin, 64 mM Natriumcitrat, Konservierungsmittel)*

<u>Auswertung</u>

Bestimmen Sie die Konzentration des LDL-Cholesterins in der Probe in mg/dl und mmol/l. Die Cholesterin-Konzentration im Überstand berechnet sich nach:

C_{Chol} (mg/dl) = **1024** · E_{Probe} (546 nm)

C_{Chol} (mmol/l) = **26,54** · E_{Probe} (546 nm)

Klinische Interpretation der Laborwerte

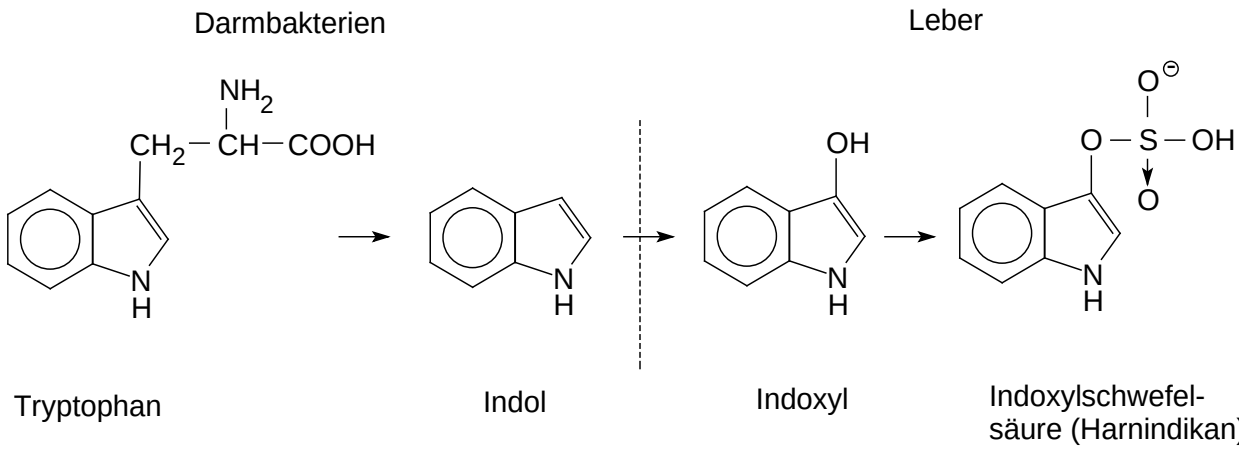
Die bei der Erhebung des Lipidstatus gewonnenne Werte erlauben eine Entscheidung darüber, ob eine Hyperlipoproteinämie therapiebedürftig (Diät,

Medikamente) ist oder nicht. Dabei gelten für Männer und Frauen die in Tabelle 1 dargestellten Richtwerte.

Aufgabe 6: Nachweis von Harnindikan

Als Beispiel einer "Entgiftungsreaktion" sei hier die Entstehung von Harnindikan behandelt. Durch bakterielle Eiweißfäulnis wird im Darm aus Tryptophan Indol gebildet. Dieses wird resorbiert, in der Leber zu Indoxyl hydroxyliert, über aktives Sulfat mit Schwefelsäure verestert und als Indoxylschwefelsäure (= Harnindikan) mit dem Urin ausgeschieden (täglich 1-30 mg): Indikan kommt in geringen Mengen auch im normalen Harn vor. Die Indikanausscheidung ist vermehrt bei Darmverschluss (Ileus), Darmlähmung (paralytischer Ileus, z.B. bei Peritonitis), stärkerer Obstipation und anormaler Darmfäulnis.

Abbildung 8:



Durchführung:

Der Versuch wird am Abzug durchgeführt. Handschuhe und Schutzbrille tragen!

Zur Bestimmung des Indikans werden ca. 10 ml Harn mit 7 ml Bleiacetat in einem Becherglas zusammengegeben. Der entstandene, dicke weiße Niederschlag von Proteinen, Bleisulfat, Bleichlorid u.a. wird durch ein Faltenfilter gegeben (Schwermetallabfall; bitte inklusive Filter im Abzug sammeln). 10 ml des klaren, kaum gefärbten Filtrates werden in einem Schraubdeckelgefäß mit 10 ml $FeCl_3$ in konz. Salzsäure **(VORSICHT!)** versetzt und 1 Minute stehen gelassen (durch die Salzsäure wird dabei Indoxyl freigesetzt und durch das 3-wertige Eisen zu Indigo oxydiert. Dieser wird mit Chloroform ausgeschüttelt). Dann gibt man 2 ml Chloroform hinzu, verschließt mit dem Schraubdeckel und schüttelt 1 min lang vorsichtig (Gummihandschuhe und Schutzbrille verwenden; nicht zu heftig schütteln, sonst bildet sich eine

Emulsion, aus der sich das Chloroform nur langsam oder gar nicht abscheidet). Das Chloroform sinkt nach unten und bildet eine blau gefärbte Schicht.

KLINISCHER ANHANG

Vorbemerkung: Man orientiere sich über die Stoffwechselfunktion der behandelten Enzyme!

Im normalen menschlichen Serum lässt sich eine Vielzahl von Enzymen nachweisen, die verschiedenen Quellen entstammen. Geordnet nach dem Wirkungsbereich lassen sich 2 große Gruppen von Enzymen trennen: Sekret-Enzyme (Gerinnungsenzyme, Pseudocholinesterase, Diastase, Lipase) und Zell-Enzyme (Transaminasen ALT (synonym GPT), AST (synonym GOT), Creatin-Kinase CK, Glutamat-Dehydrogenase GLDH, Succinat-Dehydrogenase SDH, Lactat-Dehydrogenase LDH, Sorbitdehydrogenase SDHG, Aldolase ALD).

Für die medizinische Diagnostik ist die Bestimmung der Zell-Enzyme von Bedeutung. Diese sind an den Grundstoffwechsel-Ketten der Zellen beteiligt und sind daher prinzipiell in fast allen Zellen des Organismus vorhanden. Die einzelnen Organe sind aber entsprechend ihren verschiedenen Funktionen mit diesen Enzymen unterschiedlich gut ausgestattet. Jedes Organ hat sein typisches "Enzym-Muster". Bei manchen Enzymen sind die Aktivitätsunterschiede zwischen den Organen so groß, dass sie im Extremfall nur in einem Organ in höherer Aktivität vorliegen, in den übrigen nur in Spuren. Zu diesen Enzymen zählen z.B. SDHG und Fruktose-1-phosphat-Aldolase, die nur in der Leber, und CK, die nur in der quergestreiften Muskulatur (auch Herz!)[2] wesentliche Aktivitäten aufweisen. Sie werden als organ-spezifische Enzyme bezeichnet.

Zu erwähnen sei noch, dass einige Enzyme in den einzelnen Organen deutliche Unterschiede in ihrem Aufbau zeigen. Das bekannteste Beispiel hierfür sind die 5 elektrophoretisch trennbaren Isoenzyme der LDH, die alle die gleiche Reaktion katalysieren.

[2] Hirngewebe besitzt höhere CK-Aktivität als Herzmuskel; jedoch ist die Blut-Hirn-Schrank für CK nicht durchlässig.

Auch die verschiedenen subzellulären Strukturen unterscheiden sich aufgrund ihrer Enzymausstattung. So sind, um Beispiele zu nennen, die Glutamat-Dehydrogenase (GLDH) und Succinat-Dehydrogenase (SDH) allein in den Mitochondrien, LDH und ALT nur im cytoplasmatischen Zellraum anzutreffen. Aktivitäten von AST, Malat-Dehydrogenase und Isocitrat-Dehydrogenase liegen in beiden Zellräumen vor.
Infolge der hohen Enzymaktivitäten in den Zellen, und den geringen im Plasma, besteht ein Konzentrationsgefälle zwischen intra- und extrazellulärem Raum. Es ist daher nicht verwunderlich, dass bereits bei gering ausgeprägten Zellschäden Zell-Enzyme in das Plasma austreten. Je ausgedehnter der beschädigte Bezirk ist, d.h. je mehr Zellen geschädigt wurden und je tief greifender und akuter die Schädigung ist, desto höhere Aktivitätsanstiege von Zell-Enzymen im Plasma sind zu erwarten.

Bei der akuten schweren Schädigung eines großen, enzymreichen Organs ist es möglich, schon am Anstieg der Serumaktivität nur eines organspezifischen Enzyms den Ort der Schädigung zu erkennen, so z.B. die Leber an der hohen Succinat-Dehydrogenase (SDH) bei der akuten Hepatitis. Am sichersten lässt sich jedoch eine Schädigung in einem bestimmten Organ lokalisieren, wenn man im Serum mehrere Enzyme, also ein Enzym-Muster, misst und es mit den Enzym-Mustern der in Frage kommenden Organe vergleicht. Die Bestimmung von 2-3 Enzymaktivitäten im Serum ist (nach Erhebung der Anamnese und des klinischen Befundes) gewöhnlich ausreichend, um zu einer Entscheidung zu gelangen.

A: Stellt man die Enzym-Muster der großen Organe den Enzym-Mustern, die im Serum bei Erkrankungen dieser Organe entstehen, gegenüber, so findet man in manchen Fällen, z.B. beim Herzinfarkt oder dem Schub einer progressiven Muskel-dystrophie, eine frappierende Ähnlichkeit. Bei der akuten, kurz dauernden, noch dazu kleine Gewebsteile erfassenden Zellschädigung beim Herzinfarkt ist es

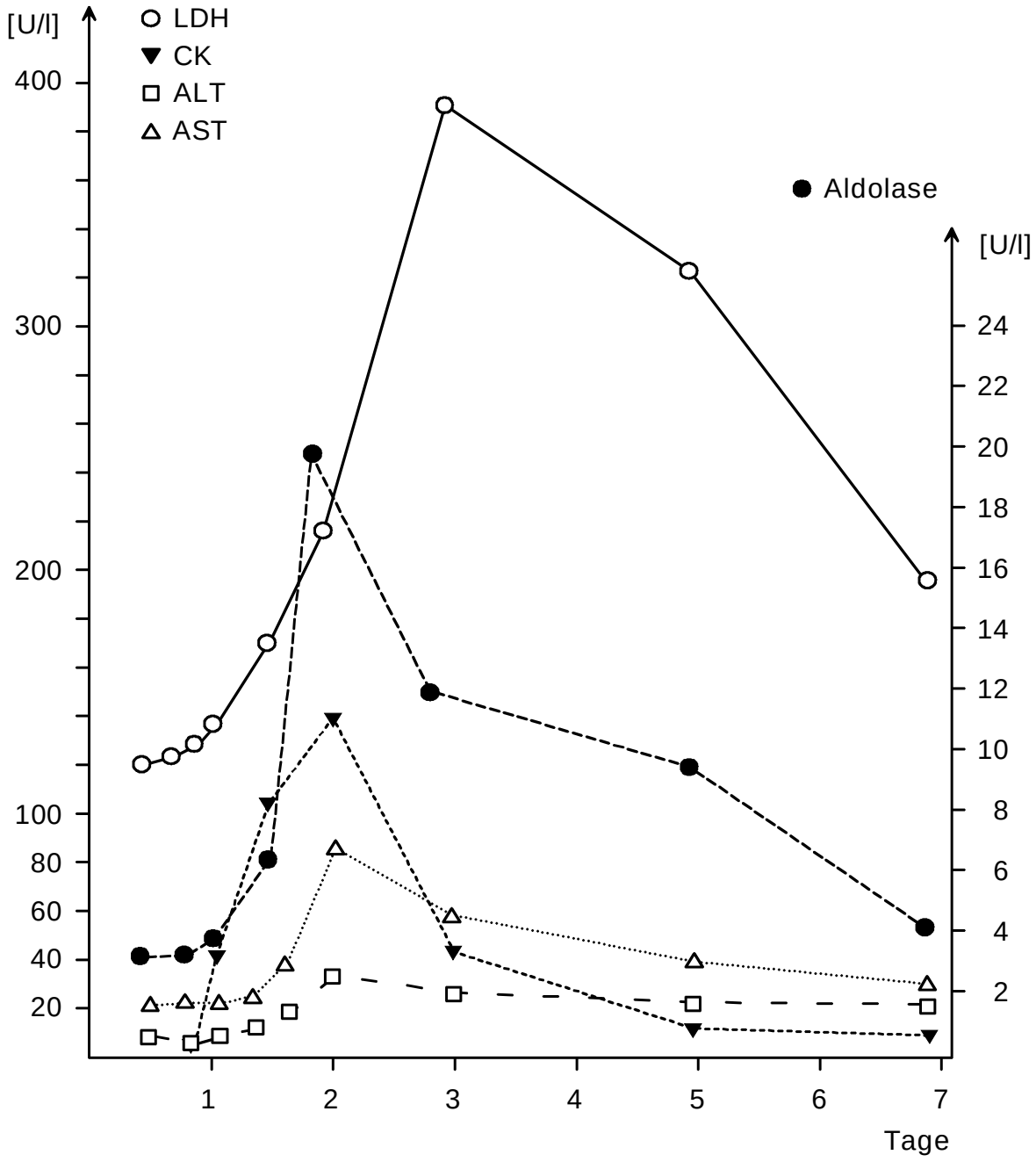


Abbildung 9

besonders wichtig, die Enzymaktivitäten im Serum "zeitgerecht" zu bestimmen, da es ja nur zum Austritt kleiner Enzymmengen aus dem Herzmuskelgewebe in das Serum kommt. Um ein Beispiel zu zeigen, ist in Fig. 8 der zeitliche Ablauf der Enzymaktivitäten beim Herzinfarkt dargestellt.

Es müssen erst einige Stunden vergangen sein, ehe man überhaupt mit einem deutlichen Enzymanstieg rechnen kann. In den ersten 6-48 Stunden ist die Messung von CK, AST und LDH (in dieser Reihenfolge) am aussichtsreichsten, um einen Herzin-farkt zu sichern oder auszuschließen, nach dem 3. Tag die Messung der LDH. Die Höhe der Enzymaktivität steht in Korrelation zur Größe des geschädigten Bezirks. Durch den schnellen Anstieg der Enzymaktivität im Serum ist die CK für die Frühdia-gnostik des Herzinfarkts wertvoll. Aufgrund ihrer Muskelspezifität gewinnt sie Be-deutung für die

Differentialdiagnose, besonders gegenüber der Lungenembolie. Hohe CK-Aktivitäten werden insbesondere bei anderen Muskelerkrankungen myogenen Ursprungs (pro-gressiver Muskeldystrophie Erb, Polymyositis, Dermatomyositis, akute Myoglobin-urie) gemessen.

Wichtig ist es zu beachten, dass auch verschiedene sekundäre Schädigungen der Skelettmuskulatur zur Erhöhung der CK im Serum führen, z.B. Unfälle, chirurgische Eingriffe, intramuskuläre Injektion von Tetracyclinen u.a. Medikamente, Schlafmittel- und Alkoholvergiftungen, cardiogener Schock, Krämpfe, ungewohnte körperliche An-strengung, Hypothyreose.

B: Bei anderen Krankheiten, z.B. der akuten Hepatitis, erkennt man zwar leicht die Leber als Herkunftsorgan der Enzyme an den hohen Aktivitäten von ALT, SDH, Fruktose-1-phosphat-Aldolase und dem Anstieg der GLDH, aber die Relation der Enzyme ist im Plasma anders als in der Leber. Das Organ-Muster erscheint im Se-rum verzerrt. Die Erfahrung hat gezeigt, dass das Ausmaß der Verzerrung wertvolle Schlüsse über Art und Ablauf - z.B. einer Lebererkrankung - erlaubt.

1. Bei schweren akuten toxischen Leberschäden (Lösungsmittelvergiftung, z.B. durch CCL_4) finden sich im Serum höhere Aktivitäten der AST als der ALT, also eine Konstellation, wie man sie in der Leber selbst findet (s.o. Enzymausstattung in Strukturen der Zellen). Da etwa 40% der AST in den Mitochondrien lokalisiert sind

(im Cytoplasma sind die Aktivitäten der AST und ALT praktisch gleich), müssen auch Mitochondrienmembranen zerstört worden sein. Es liegt also eine schwere Zellschädigung vor. Da weiterhin die AST rascher als die ALT im Serum inaktiviert wird, muss sich die Schädigung in einem akuten Stadium befinden.

2. Bei der akuten Hepatitis werden zu Beginn der Erkrankung meist etwas höhere Aktivitäten der ALT als der AST gemessen. Der Schluss liegt nahe, dass bei der akuten Hepatitis die allgemeine Zellschädigung in der Leber ganz vorwiegend den cytoplasmatischen Raum betrifft, aus dem AST und ALT zu etwa gleichen Teilen ins Serum austreten. Die schnellere Inaktivierung der AST führt bald zu den beobach-teten höheren ALT-Spiegeln. Ist die AST-Aktivität nahezu so hoch wie die der ALT, oder übersteigt sie diese, bei hoch bleibenden Aktivitäten der beiden Transaminasen während des Krankheitsverlaufs, so weist das auf eine schwere nekrotisierende Form (mit Zelluntergang) der Hepatitis hin; dann findet man auch hohe GLDH-Akti-vitäten (aus den Mitochondrien).

   Die Höhe des Enzymanstiegs im Serum ist ein Maß für die momentane Schwere der Zellschädigung. Der Krankheitsverlauf ist leicht durch wiederholte Transaminase-Bestimmungen zu kontrollieren. Von einer Ausheilung kann erst gesprochen werden, wenn die Transaminase-Aktivitäten normal geworden sind (siehe nachstehende Tabelle) und bei körperlichen Belastungen normal bleiben.

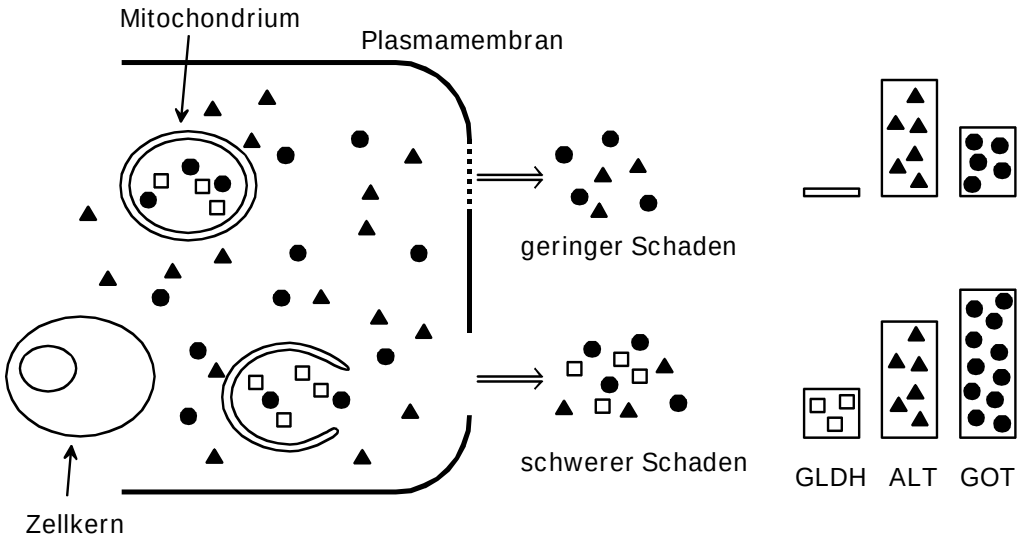


Abbildung 10: Enzym-Muster bei unterschiedlichem Grad einer Zellschädigung

3. Normalisieren sich die Aktivitäten nach einer akuten Hepatitis nicht, so muss mit dem Übergang in eine persistierende oder in eine chronische Hepatitis gerechnet werden. Die Unterscheidung ist nur histologisch möglich (Leberbiopsie!). Bei den chronischen Leberkrankheiten (Cirrhosen) kompliziert sich nämlich das Bild dadurch, dass hier in der Leber durch Zelluntergang und Zellumbau nicht mehr das normale Enzym-Muster vorliegt, sondern die Leber spezifischen Enzyme, darunter auch ALT, im Organ vermindert sind. Dies führt zu einem relativ stärkeren AST-Anstieg im Serum. Um zu prüfen, inwieweit das Leber-ähnliche Verhältnis der beiden Transamina-sen auf eine Verschiebung ihrer Aktivitäten im cytoplasmatischen Raum der Leberzelle zugunsten der AST oder auf das Vorliegen von Zellnekrosen zurückzuführen ist, dient dann die Messung der GLDH im Serum: wenn dieses mitochondriale Enzym trotz mäßigen Transaminase-anstiegs im Serum relativ hoch ist, spricht das für eine verstärkte Nekrose-Rate in der Leber.

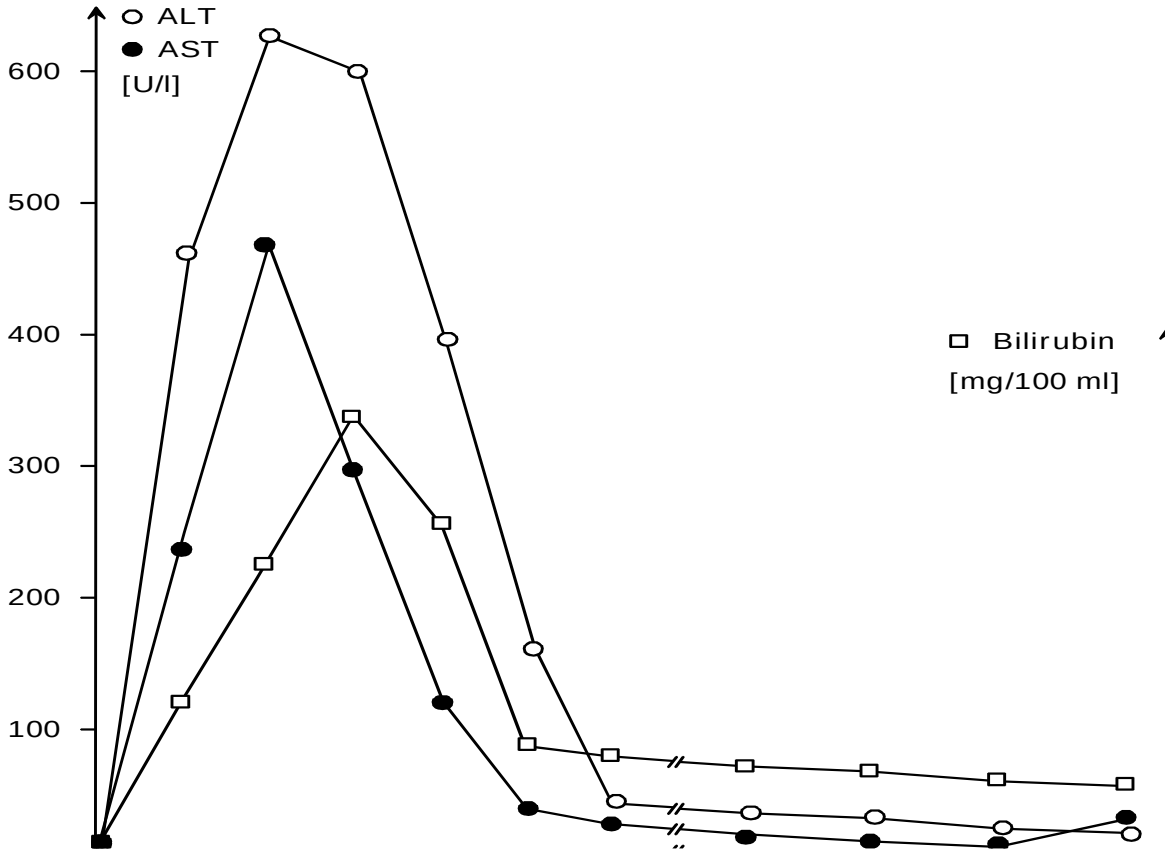


Abbildung 11: Enzym-Aktivitäten und Bilirubinkonzentration im Serum im Verlauf der akuten Hepatitis

Schwierig kann die Analyse von Serum-Enzym-Mustern werden, wenn eine Erkrankung zum Enzym-Austritt aus mehreren Organen führt. Besonders wichtig für die Verlaufsbeobachtung werden solche Überlagerungen von Enzym-Mustern, wenn sie im Ablauf von Erkrankungen neu hinzutreten und damit Hinweise auf Komplikationen geben. So ist, um bei den Enzym-Verteilungsmustern in Herz und Leber zu bleiben, die Überlagerung des typischen Infarkt-Musters durch das Auftreten höherer Aktivitäten von ALT das früheste Indiz für eine akute Stauungsleber im Gefolge der cardialen Schädigung (Herzdekompensation).

Mit dem Auftreten der Leberstauung steigt die Aktivität Leber-spezifischer Enzyme im Serum. Die für den Herzinfarkt typische Differenz im Anstieg der beiden Transaminasen schwindet. Die Aktivität der ALT nähert sich oder übersteigt den Wert der AST. Die Aktivität der SDH steigt im Serum an. Als Zeichen der abklingenden Herzmuskelnekrose fallen die Aktivitäten der muskelspezifischen CPK.

Normalwerte der wichtigsten Enzymaktivitäten im Serum

Enzym	**Aktivität [U (µmol · min^{-1}) pro Liter]**	**Messtemperatur**
AST	bis 22	25°C
ALT	bis 18	25°C
CK	10 - 70	25°C
GLDH	bis 4	25°C
LDH	120 - 240	25°C
SDH	bis 0,4	25°C
ALD	bis 6	25°C
Amylase	4000	37°C

Praktische Aufgaben 1 bis 6

Praktikumsgruppe:

Namen der Praktikanten:

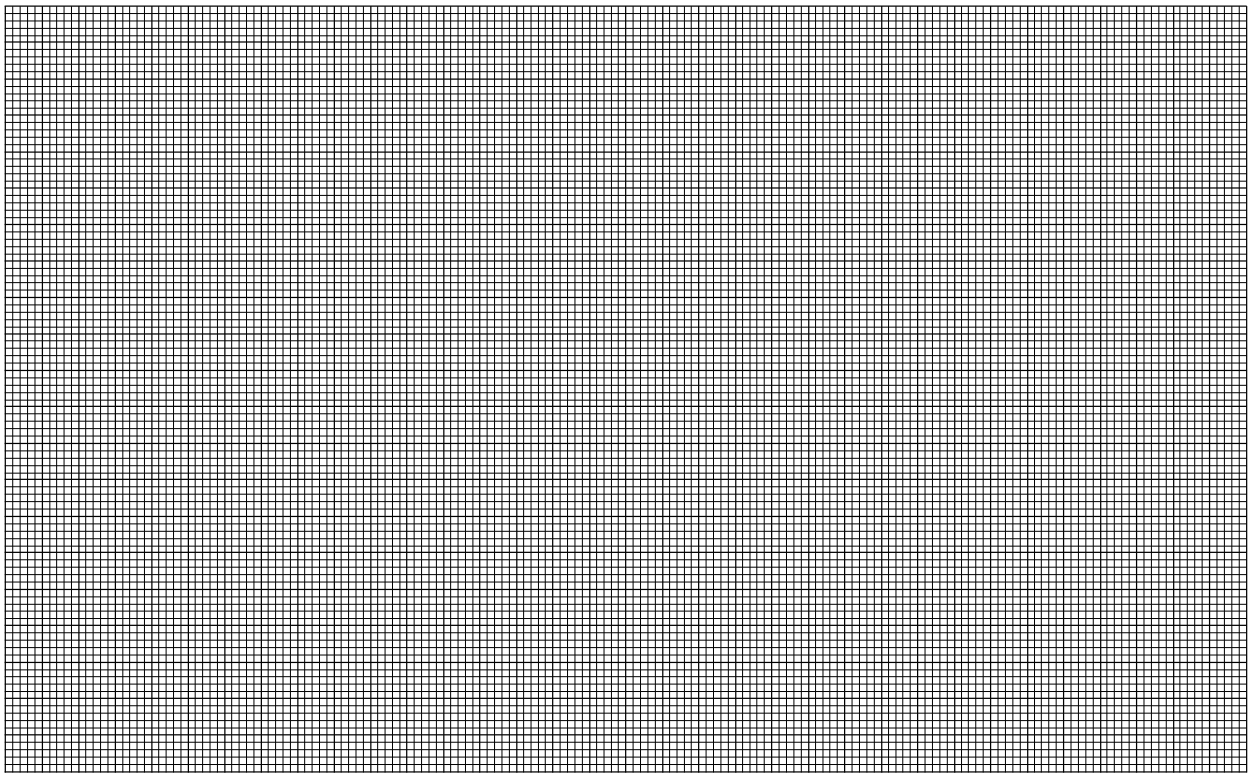
Aufgabe 1:

Zeitpunkt	**0 min**	**1 min**	**2 min**	**3 min**	**4 min**	**5 min**
Extinktion						
Aktivität						

Berechnen Sie die Aktivität der ALT in U/l Serum (1U = 1µmol/min) nach der allgemeinen Gleichung zur Berechnung von Enzymaktivitäten bei photometrischen Bestimmungsverfahren. Den Extinktionskoeffizienten (ε) für NADH finden Sie auf Seite 184.

$$\text{Aktivität} = \frac{\Delta E \cdot \text{Gesamtvolumen}}{\Delta t \cdot \varepsilon \cdot d \cdot \text{Volume der Probe}} = \frac{\Delta E \cdot [ml]}{[min] \cdot [l \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}] \cdot [cm] \cdot [ml]}$$

Umsatz = 10^6 für mol in µmol



Diskussion der Ergebnisse:

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

Aufgabe 2:

	Leerwert	**Standard**	**Probe**
Extinktion			
Konzentration [mmol/l]			

Berechnung mittels Dreisatz

Die Verdünnungsgrenze liegt bei 6,66 mmol/l. Bei höheren Konzentrationen muss die Probe verdünnt werden und das Ergebnis mit dem Verdünnungsfaktor korrigiert werden. Die Normalwerte liegen bei 333-583 mmol/24 h im Harn und bei 1,7 - 8,3 mmol/l im Serum.

Diskussion der Ergebnisse:

.....

.....

.....

.....

Aufgabe 3:

Die Aktivität von XOD und von Uricase kann aus den jeweiligen, graphisch zu ermittelnden Anfangsgeschwindigkeiten der geeigneten Phase des Reaktionsablaufs und aus ε_{293} für Harnsäure (= 11,6 • 10^3 $mol^{-1}cm^{-1}$) berechnet werden.

Diskussion der Ergebnisse:

.....

.....

.....

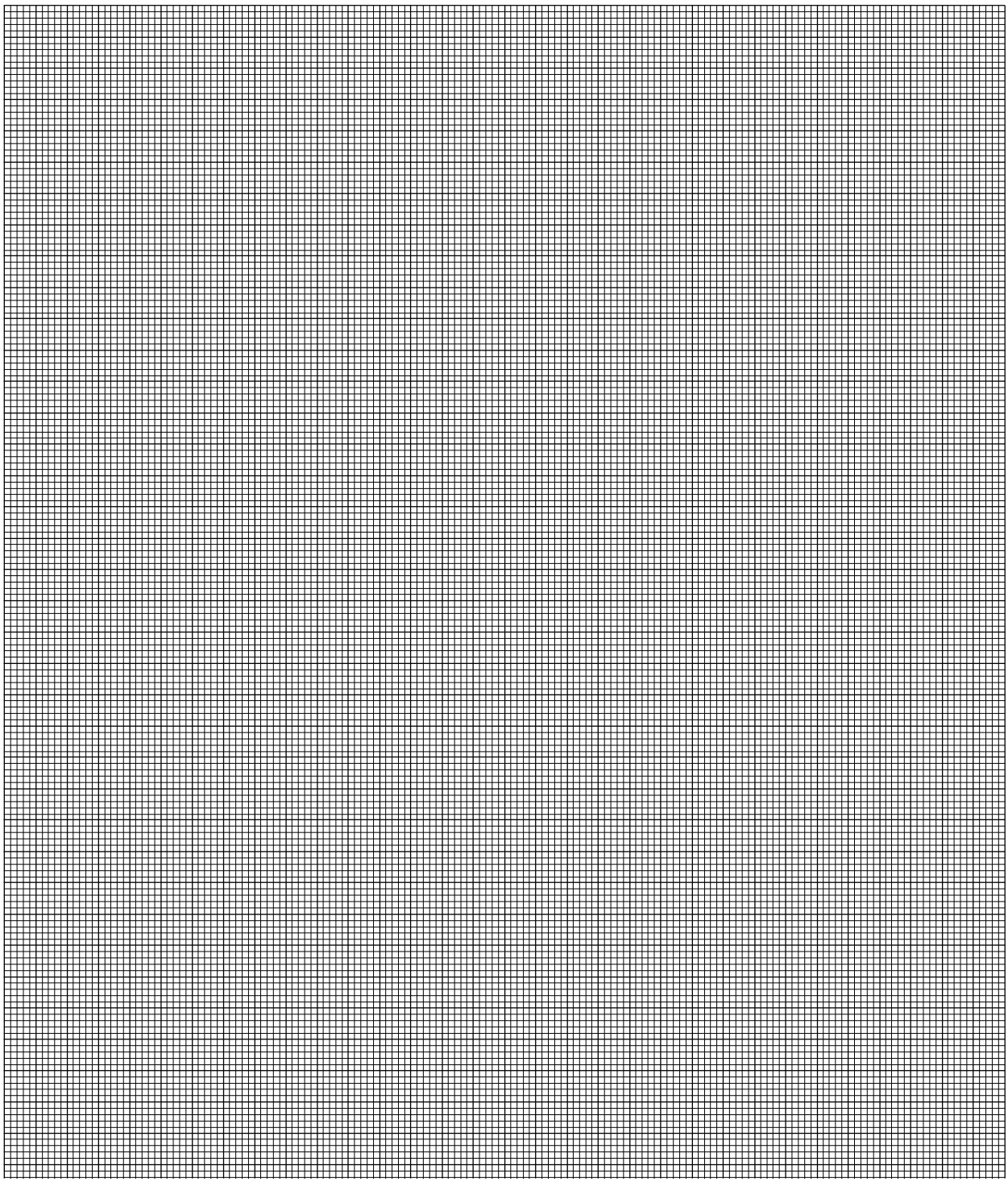
.....

.....

.....

.....

.....



Aufgabe 4:

	Gesamt-Bilirubin	**Standard**	**Leerwert 1**	**direktes Bilirubin**	**Leerwert 2**
Extinktion					
Bilirubingehalt					

Die Bestimmungsmethode ist bis 25 mg/100 ml linear.

Berechnung: $\frac{E_{Ansatz} \cdot 10}{E_{Standard}} = \text{mg Bilirubin / 100 ml}$

Diskussion der Ergebnisse:

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

Aufgabe 5:

a) Bestimmen Sie die Konzentration des Cholesterins in der Probe in mg/dl und mmol/l:

C_{Chol} (mg/dl) = **852,8** · E_{Probe} (546 nm)
C_{Chol} (mmol/l) = **22,06** · E_{Probe} (546 nm)

b) Bestimmen Sie die Konzentration des HDL-Cholesterins in der Probe in mg/dl und mmol/l:

C_{Chol} (mg/dl) = **650,2** · E_{Probe} (546 nm)
C_{Chol} (mmol/l) = **16,82** · E_{Probe} (546 nm)

c) Bestimmen Sie die Konzentration des LDL-Cholesterins in der Probe in mg/dl und mmol/l. Die Cholesterin-Konzentration im Überstand berechnet sich nach:

C_{Chol} (mg/dl) = **1024** · E_{Probe} (546 nm)
C_{Chol} (mmol/l) = **26,54** · E_{Probe} (546 nm)

Diskutieren Sie die Werte anhand der dazugehörigen Tabelle 1. Ist eine Behandlung notwendig?

	Probe 1		
	Extinktion	**[mg/dl]**	**(mmol/l)**
Gesamt Cholesterin-Gehalt			
HDL-Cholesterin-Gehalt			
LDL-Cholesterin-Gehalt			

Diskussion der Ergebnisse:

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

Aufgabe 6:

Diskussion der Ergebnisse:

.....

.....

.....

.....

.....

.....

BIOCHEMISCHES PRAKTIKUM VII

Regulation des Stoffwechsels, Hormone

Aufgabe 1: **Allosterische Beeinflussung und kooperative Wechselwirkung bei dem Enzym Pyruvatkinase (E.C. 2.7.1.40)**

Aufgabe 2 **Untersuchung einer membranständigen Phosphodiesterase**

Aufgabe 3 **Induktion der β-Galactosidase in Escherichia coli**

Aufgabe 4: **Analyse von Steroidmustern unterschiedlicher Organe**

Aufgabe 5 **Untersuchung zur Stimulierung von Zellen durch Mineralocorticoide**

Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
Biochemisches Institut
In der Medizinischen Fakultät
Olshausenstrasse 40, 24098 Kiel

Stichworte

Regulation der Enzymaktivität:

- durch Substratkonzentration: Produkt- und Substrathemmung.
- durch allosterische Effektoren: Eigenschaften allosterischer Enzyme, Rückkopplung, Kooperativität.
- durch kovalente Modifikation: Proteinkinasen, Proteinphosphatasen.
- durch Beeinflussung der Transkription: Enzyminduktion und Enzymrepression, Operon, Operator, Regulatorgen, Promotoren, Transkriptionsfaktoren.

Hormone und Signalketten:

- Zellmembranständige Rezeptoren:
  Proteohormone, Katecholamine, first messenger, second messenger, cAMP, Proteinkinase A, Adenylatcyclase, G-Proteine, Phosphodiesterase.
- Cytosolische/nukleäre Rezeptoren:
  Steroidhormone, Schilddrüsenhormone.

Einleitung

Die Regulation des Stoffwechsels

Die Regulation des Stoffwechsels erfolgt durch Kontrolle und gezielte Beeinflussung der Aktivität von Enzymen. Die Enzymaktivität wird definitionsgemäß als Substratumsatz pro Zeiteinheit gemessen. Bei der Übermittlung von Signalen zur Regulation der Enzymaktivität spielen Hormone eine wichtige Rolle.

Die Zelle hat viele Möglichkeiten, die Enzymaktivität zu beeinflussen, z. B.:

1. durch Änderung der Substrat-, Kosubstrat- und Produktkonzentrationen,
2. durch Änderung des Reaktionsmilieus (z. B. pH-Wert, Ionenstärke),
3. durch Veränderung der Struktur des Enzymproteins (Konformationsänderungen, kovalente Modifikationen),
4. durch Änderung der Enzymmenge (Beeinflussung von Enzymsynthese, Enzymstabilität, Enzymabbau oder Enzymtransport durch Membranen).

Die Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Substratkonzentration nach dem Michaelis-Menten-Modell (Punkt 1) und vom Reaktionsmilieu (Punkt 2) wurden im Praktikum III behandelt. Dieser Praktikumsteil beschäftigt sich mit der Veränderung der Struktur von Enzymproteinen (Punkt 3) und mit der Regulation der Enzymmenge (Punkt 4).

Bei der Übermittlung von Regulationssignalen spielen Hormone eine besonders wichtige Rolle. In vielen Fällen wird das von Hormonen als „first messenger“ ausgelöste Signal durch eine Signalkette übernommen und intrazellulär weitergeleitet, in der verschiedenartige „second messenger“ wirksam sind. In diesem Praktikum werden Aufgaben zum Vergleich von Hormonen und zu einem "second messenger" durchgeführt.

A. Regulation durch Veränderung der Struktur des Enzymproteins (rasche oder Kurzzeit-Regulation)

I. Allosterische Beeinflussung der Enzymaktivität:

Für die Funktion der lebenden Zellen ist die Regulation der Enzymaktivität durch „feed back“-(Rückkopplungs-)Kontrolle unerlässlich. Hier wirken Metaboliten als Aktivatoren oder Inhibitoren, die in den meisten Fällen keine sterische Ähnlichkeit mit dem Substrat des regulierten Enzyms besitzen („allosterische Effektoren“). Sie werden reversibel an spezielle „allosterische“ Bindungsorte gebunden und die Spezifität der allosterischen Enzyme für ihre Effektoren ist oft ebenso groß wie ihre Substratspezifität.
In fast allen Stoffwechselketten wurden allosterisch regulierbare „Schlüsselenzyme“ gefunden. Die Effektoren dieser Enzyme sind meistens Endprodukte der Stoffwechselkette. Ein Beispiel ist die Aspartat-Transcarbamylase, ein Enzym der Pyrimidinbiosynthese, mit dem Endprodukt-Hemmstoff Cytidintriphosphat (CTP). Für dieses Enzym ist der Aufbau aus regulatorischen und katalytischen Untereinheiten mit den Bindungsstellen des Subtratanalogons PALA und des Effektors CTP schematisch in Abbildung 1 gezeigt.

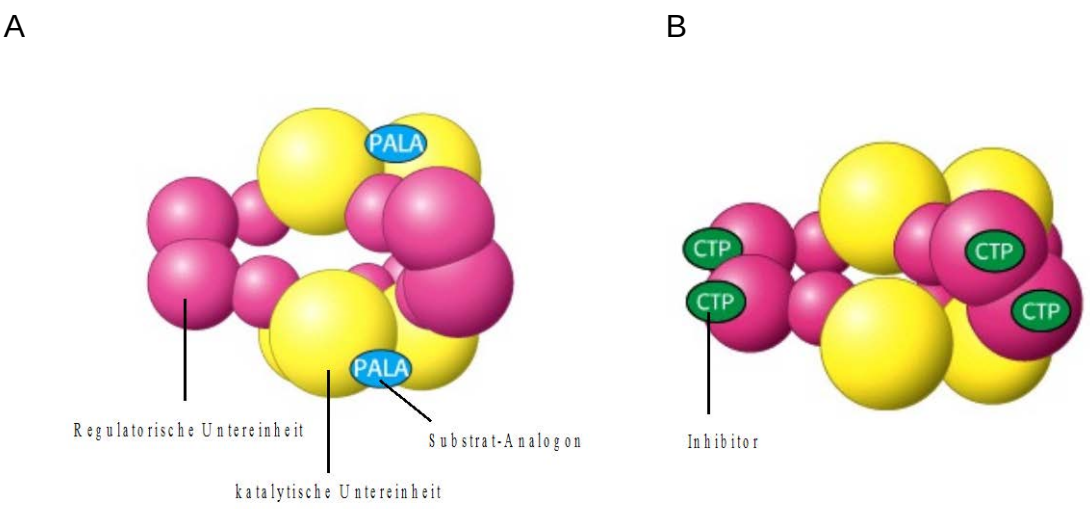


Abbildung 1: Anordnung der Untereinheiten der Aspartat-Transcarbamylase.
A: Anordnung der Untereinheiten in der katalytisch aktiveren Form und Bindung des Substratanalogons PALA. B: Anordnung der Untereinheiten in der katalytisch inaktiveren Form und Bindung des Inhibitors CTP.

Eine Beeinflussung der katalytischen Aktivität des Enzyms durch allosterische Effektoren kann nur durch Änderung der sterischen Konformation des Enzyms bei der Effektorbindung erklärt werden. Die Konformationsänderung kann die katalytische Wirkung behindern oder erhöhen. Es resultiert dann eine nicht-kompetitive Kinetik. Beim Beispiel der Aspartat-Transcarbamylase bewirkt der Inhibitor CTP die Stabilisierung der katalytisch inaktiveren Konfomationsanordnung (Abbildung 1B). Die Hemmung durch CTP und die Denaturierung der inhibitorischen Eigenschaften ist in Abbildung 2 dargestellt.

Ein gemeinsames kinetisches Charakteristikum vieler allosterischer Enzyme ist das Auftreten sigmoider anstelle von hyperbolischen Kurven bei Auftragung von [S] (Abbildung 2, Kurve A) oder [I] gegen V. Anstelle der Michaelis-Menten-Gleichung:

$$v = v_{max} \frac{[S]}{[S] + K_M}$$ tritt die Gleichung $$v = v_{max} \frac{[S]^h}{[S]^h + K_M{}^h}$$

Der Exponent h (Hill-Koeffizient) bestimmt das Ausmaß der sigmoiden Durchbiegung. Bei h = 1 geht die Kurve in die Hyperbel über. Die Anwesenheit des Inhibitors bewirkt eine Rechtsverschiebung der Kurve und eine verstärkte sigmoidale Durchbiegung (Abbildung 2, Kurve B); die Anwesenheit eines Aktivators hat den gegenteiligen Effekt.

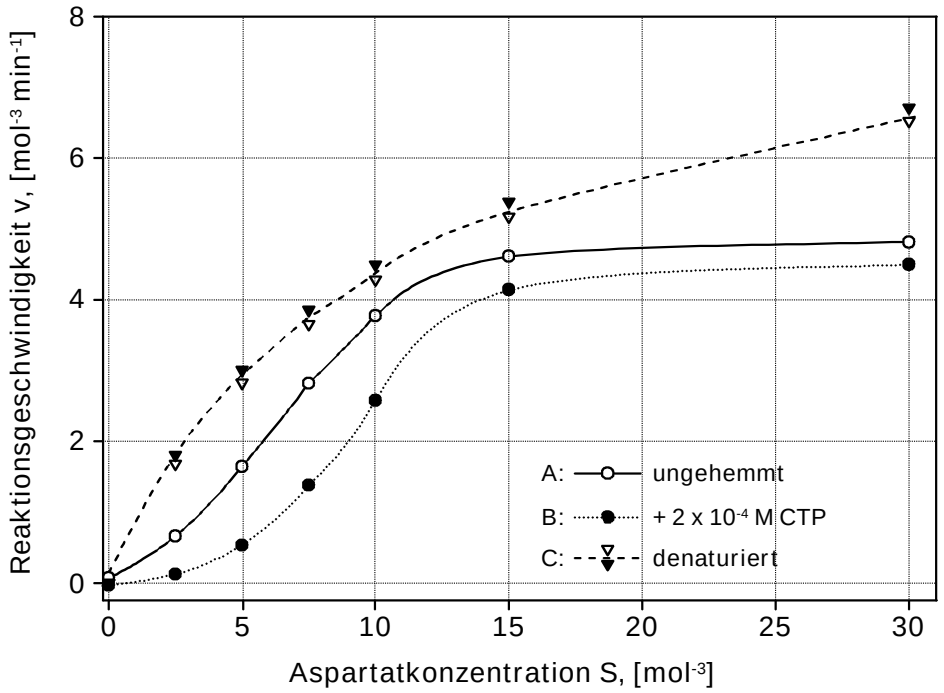


Abbildung 2: Substratabhängigkeit der Aspartat-Transcarbamylase-Reaktion.

A: ungehemmt. **B**: in Gegenwart von 2x 10^{-4} M CTP. **C**: nach Denaturierung der regulatorischen Untereinheit durch Wärme. Reaktion in Ab- (▼—▼) bzw. Anwesenheit (▽—▽) von CTP.

Enzyme mit derartiger sigmoidaler Kinetik sind Oligomere, d. h. aus mehreren Untereinheiten zusammengesetzt, die entweder identisch oder unterschiedlich sein können. Im letzteren Fall ist der Substratbindungsort und das aktive Zentrum auf der katalytischen Untereinheit lokalisiert. Der Bindungsort für den Effektor befindet sich hingegen auf der regulatorischen Untereinheit (siehe auch Aufbau und Bindungsstellen der Aspartat-Transcarbamylase, Abbildung 1). Die sigmoiden Kurven in Abbildung 2 beruhen auf dem kooperativen Effekt der Untereinheiten: die Bindung von Substrat oder Effektor an einer Untereinheit verändert die Affinität für das Substrat oder den Effektor der anderen Untereinheit. Die Voraussetzung hierfür ist jedoch eine intakte Kopplung zwischen den Untereinheiten. So führt eine Dissoziation des Oligomers zur Messung von hyperbolischen anstatt von sigmoidalen Kurven (vergleiche hierzu auch die O_2-Bindungskurven von tetramerem Hämoglobin und von monomerem Myoglobin). Den gleichen Effekt hat auch die partielle Denaturierung, z. B. durch Hitze oder Quecksilber.

II. Substrathemmung

Liegt Substrathemmung vor, so ergeben sich in der doppelt reziproken Auftragung nach Lineweaver-Burk keine Geraden, sondern Kurven des in Abbildung 3 gezeigten Typs. Diese Enzyme besitzen mindestens einen zweiten Substratbindungsort (allosterisch). Das an diesem allosterischen Bindungsort gebundene Substrat kann nicht in Produkt umgesetzt werden, wirkt aber als Inhibitor der katalytischen Aktivität. Die Bindungskonstante K des aktiven Zentrums muss kleiner als die des allosterischen Zentrums sein, da sonst das Enzym praktisch immer gehemmt wäre.

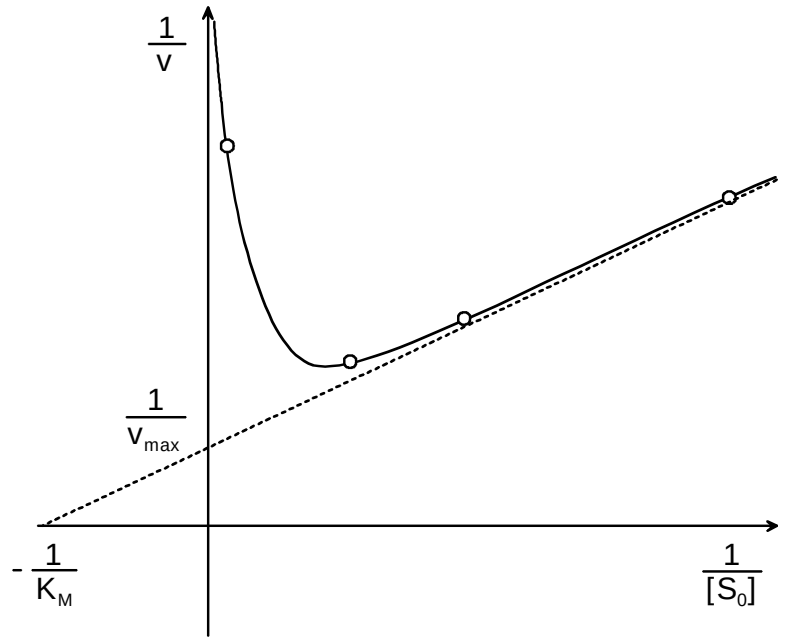
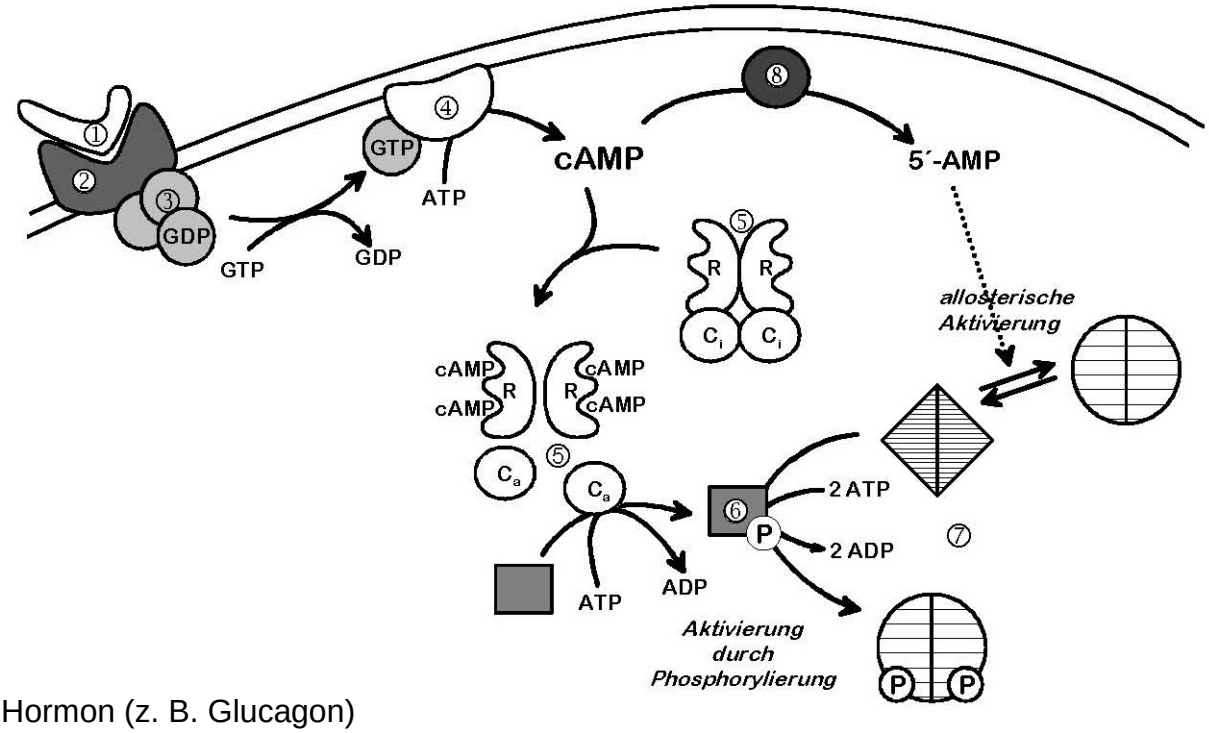


Abbildung 3:
Substrathemmung der Phosphofructokinase durch ATP (Hemmstoff und Substrat).

III. Beeinflussung der Enzymaktivität durch kovalente Modifikation

Zahlreiche Enzyme werden durch reversible Phosphorylierung an Tyrosin-, Serin- oder Threoninresten aktiviert, bzw. inaktiviert. Die Übertragung der Phosphatgruppe wird durch spezifische Proteinkinasen unter ATP-Verbrauch vermittelt. Die Abspaltung der Phosphatgruppen erfolgt durch spezifische Proteinphosphatasen.
Einige Hormone, z. B. Adrenalin oder Glucagon (siehe ①, Abbildung 4), wirken in der Zelle über cAMP als „second messenger“. Dieses wird aus ATP bei der G-Protein (siehe ③, Abbildung 4)-vermittelten Aktivierung der Adenylatcyclase (siehe ④, Abbildung 4) gebildet. Die erhöhte cAMP-Konzentration führt zum Beispiel durch eine Serie von cytosolischen Enzym-Reaktionen letztendlich zur Phosphorylierung der Glykogenphorylase b, die dadurch in die aktive Form Glykogenphosphorylase a (siehe ⑦, Abbildung 4) überführt wird. Die involvierte Proteinkinase A wird von cAMP allosterisch aktiviert (cAMP-abhängige Proteinkinase, PKA, siehe ⑤, Abbildung 4). Diese Reaktions-Kaskade wird reguliert, indem das cAMP relativ rasch durch eine membranständige Phosphodiesterase (siehe ⑧, Abbildung 4) zu 5'-AMP abgebaut wird. Dagegen muss die durch die kovalente Modifikation aktivierte Phosphorylasekinase a und Glykogenphosphorylase a durch entsprechende Proteinphosphatasen dephosphoryliert werden, um die Wirkung des Hormons zu beenden.



① Hormon (z. B. Glucagon)

② Rezeptor

③ G-Protein

④ Adenylatcyclase

⑤ Proteinkinase A (R_2C_{i2} → R_2C_{a2})

⑥ Phosphorylasekinase b → a

⑦ Glykogenphosphorylase b → a

⑧ Phosphodiesterase

Abbildung 4: Die Aktivierungskaskade der Glykogenphosphorylase

B. Regulation der Enzymsynthese durch Änderung der Enzymmenge (Langzeit-Regulation)

Einer der wichtigsten Regulationsmechanismen in allen Lebewesen ist die Beeinflussung der Transkription von Enzym-Genen durch regulatorische Proteine, die ihrerseits durch allosterisch wirkende Kleinmoleküle aktiviert werden. Hierdurch wird die Synthese von messenger-RNA (Prokaryonten), bzw. prä-messenger-RNA (Eukaryonten) verändert, welches im Rahmen der Proteinbiosynthese zu veränderten Enzymmengen führt. Im Praktikumsversuch wird die Genaktivierung („Enzyminduktion“) in einem Bakterium durchgeführt. Sie stellt ein Modell der entsprechenden Vorgänge bei Eukaryonten dar, die wesentlich komplizierter sind und die Wirkung bestimmter Hormone einschließen.

C. Hormonelle Regulation

Hormone sind Botenstoffe, die in spezifischen Drüsen oder Geweben synthetisiert werden. Sie werden z.B. ins Blut ausgeschüttet und wirken in kleinen Mengen an unterschiedlichen Zielzellen des Körper. Sie binden an spezifische Rezeptoren ihrer Zielzellen und verändern deren Eigenschaften in charakteristischer Weise. Je nach Reichweite der hormonellen Wirkung unterscheidet man drei verschiedene Arten der Signalübertragung:

1) Endokrine Signalübertragung: dabei werden Hormone von hormonproduzierenden Zellen ins Blut abgegeben. Im Blut können sie zu weit entfernten Zielzellen transportiert werden und dort an spezifische Rezeptoren binden.
2) Parakrine Signalübertragung: Hormone wirken auf benachbarte Zellen
3) Autokrine Signalübertragung: Spezialfall der parakrinen Signalübertragung. Hierbei produziert eine Zelle Signalstoffe, mit denen sie sich selber stimuliert.

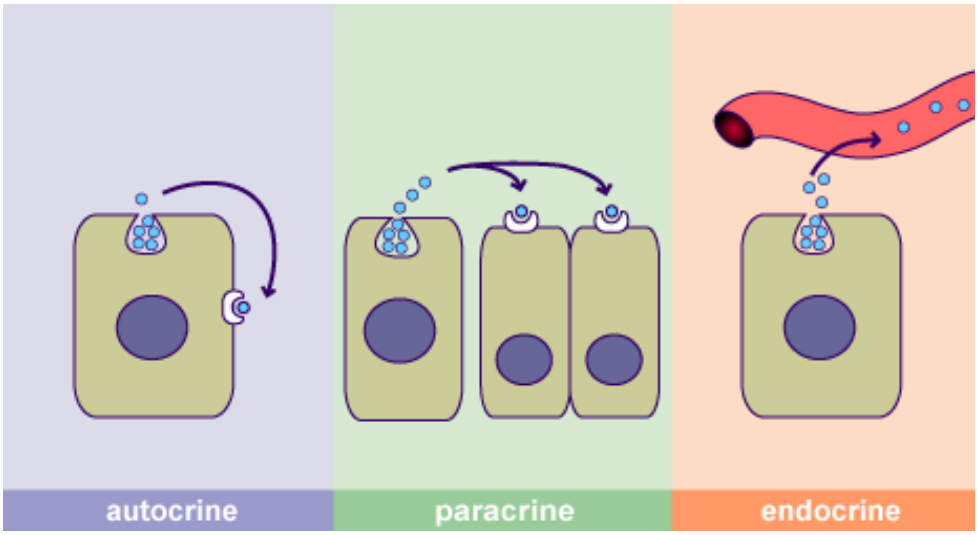


Abbildung 5: Wege der hormonellen Signalübertragung

Aufgrund ihrer biochemischen Eigenschaften kann man Hormone in zwei Gruppen unterteilen, die völlig unterschiedliche Wirkungsmechanismen besitzen:

Gruppe 1:
Hydrophile Hormone (Peptidhormone, Proteine, Katecholamine) können die Zellmembran nicht passieren. Sie dringen nicht in die Zelle ein, sondern binden an der Außenseite der Plasmamembran an Membranrezeptoren. Die Hormonbindung aktiviert membrangebundene Enzyme, die eine Synthese von „second messenger"-Molekülen katalysieren; diese lösen über Signalketten die spezifischen Hormoneffekte aus (siehe auch Abbildung 4). Die wichtigsten „second messenger" sind cyclisches AMP (cAMP), Calcium (Ca^{2+}) und aus Membranphospholipiden erzeugtes Inositoltrisphosphat (IP_3) / Diacylglycerin (DAG). In der Regel handelt es sich hierbei um schnell reagierende Systeme (Sekunden bis Stunden), die auch schnell wieder abgeschaltet werden können.

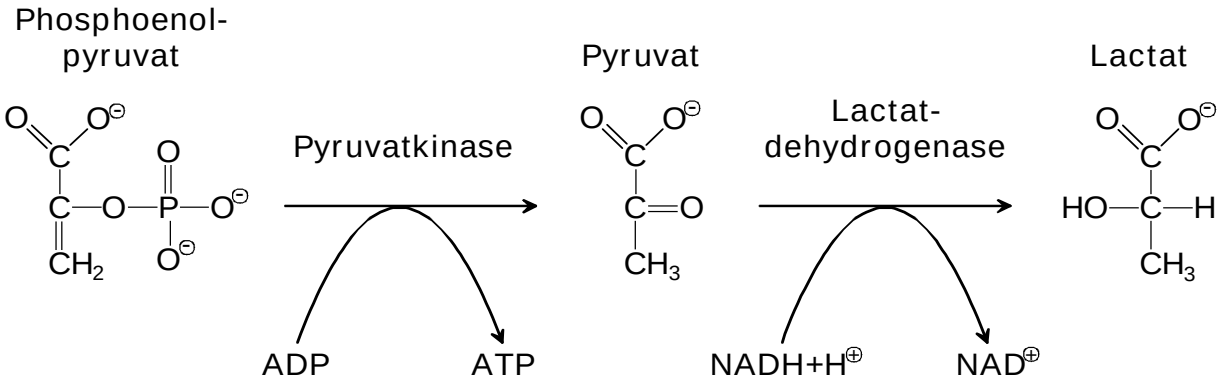
Gruppe 2:

Lipophile Hormone können durch die Zellmembran diffundieren und somit an intrazelluläre Proteine binden. Die Hormone interagieren zunächst mit einem cytoplasmatischen Rezeptor und der Hormon-Rezeptor-Komplex wird in den Zellkern transportiert, wo er sich gemeinsam mit weiteren Proteinen (Transkriptionsfaktoren) an spezifische DNA-Abschnitte (Enhancer, Silencer) bindet und als Transkriptions-modulator wirkt. Hormone dieses Typs sind Steroidhormone und Schilddrüsenhormone (T3, T4). In der Regel handelt es sich um langsamer reagierende Systeme (Stunden bis Tage) mit lang anhaltenden Wirkungen.

Aufgabe 1: Allosterische Beeinflussung und kooperative Wechselwirkung bei dem Enzym Pyruvatkinase (E.C. 2.7.1.40)

Prinzip des Tests:

Phosphoenolpyruvat (PEP) wird durch die Pyruvatkinase (PK) in Pyruvat umgesetzt. Die angekoppelte Indikatorreaktion der Lactatdehydrogenase (LDH) überführt den Pyruvat-zuwachs in eine Abnahme von NADH + H^+.



Die Extinktionsabnahme von NADH + H^+ lässt sich photometrisch bestimmen (siehe Praktikum V). Fructose-1,6-bisphosphat (FBP) ist ein allosterischer Effektor dieser Reaktion.

Benötigte Lösungen:

(werden im Eisbad, das am Photometer mit Papierschreiber steht, bereitgestellt)

Testpuffer		25	mM	Tris
	+	225	mM	KCl
	+	23	mM	MgCl2, eingestellt auf pH 8,0
Coenzym-Lösung		40	mM	ADP
	+	4,8	mM	NADH, angesetzt in Testpuffer
PEP-Lösung		20	mM	Phosphoenolpyruvat, angesetzt in Testpuffer
LDH-Lösung		100	U/ml	Lactatdehydrogenase, angesetzt in Testpuffer
FBP-Lösung		50	mM	Fructose-1,6-bisphosphat, angesetzt in Testpuffer
Pyruvatkinase (PK)	Homogenisierte Rattenleber wurde bei 100 000 g zentrifugiert und der Überstand, der die löslichen cytoplasmatischen Enzyme enthält, wurde mit Testpuffer so eingestellt, dass die PK eine Aktivität von 0,6 µU/ml hat			

Versuchsdurchführung:

1. In einem Wasserbad (25°C) werden 4 Reagenzgläser mit folgendem Inhalt für ca. 10 Minuten temperiert:

Röhrchen-Nr.:	Lösungen:			
1 (Puffer)		5	ml	Testpuffer
2 (Enzymlösung)		500	µl	Coenzymlösung (NADH, ADP)
	+	500	µl	LDH-Lösung Enzymlösung
	+	500	µl	Pyruvatkinaseüberstand
3 (Substrat)		800	µl	PEP-Lösung
4 (Effektor)		150	µl	FBP-Lösung

2. Vor der Messung wird das 366 nm-Filter in das Photometer eingesetzt. Durch Senken des Schreiberstifts und Einschalten des Papiervorschubs wird der zeitliche Verlauf der Extinktionswerte aufgezeichnet. Die Vorschubgeschwindigkeit kann an der Seite des Schreibers abgelesen werden. Sie ist auf 2 cm/min. voreingestellt. Während der folgenden 7 Versuchsansätze kann der Schreiber eingeschaltet bleiben.

Für die im folgenden Pipettierschema aufgeführten Versuche 1 bis 7 wird entsprechend den Punkten 3 bis 5 verfahren.

Versuch Nr.	Puffer µl (1)	Enzymlösung µl (2)	PEP-Lösung µl (3)	FBP-Lösung µl (4)
1	700	150	5	10
2	700	150	10	10
3	680	150	20	10
4	650	150	50	10
5	600	150	100	10
6	550	150	150	10
7	400	150	300	10

3. Puffer (1) und Enzymlösung (2) werden in einer verjüngten (Halbmikro-) Küvette gemischt und in das Photometer gestellt. Damit die Extinktion im Versuchsverlauf hinreichend abnehmen kann, muss sie nun durch Einstellen der Skala am Photometer jeweils in den Bereich zwischen 0,75 und 1,0 gebracht werden. Die Abnahme der Extinktion für den Leerwert wird nun für ca. 2 Minuten bestimmt.

4. Die Enzymreaktionen werden jeweils durch Zugabe der entsprechenden PEP-Menge (3) direkt in die Küvette gestartet (dabei kann mit der Pipette die Lösung gleichzeitig gemischt werden). Die Reaktion wird für ca. 2 Minuten verfolgt, so dass anhand einer Geraden auf dem Schreiberpapier durch die Extinktionsänderung (ΔE366) mit der Zeit (ΔT) die Aktivität des Enzyms bestimmt werden kann.

5. Anschließend werden 10 µl des allosterischen Effektors, die FBP-Lösung (4), wieder direkt in die Küvette zugegeben. Nach erneutem Mischen wird wieder über einen Zeitraum von ca. 2 Minuten die Extinktionsänderung bestimmt.

Aufgabe 2: Untersuchung einer membranständigen Phosphodiesterase

Der Zusammenhang zwischen den membranständigen Enzymen Adenylatcyclase und Phosphodiesterase soll hier anhand von Membranen von Hühnererythrozyten untersucht werden. Als kernhaltige Zellen enthalten Erythrozyten von Vögeln noch das Adenylatcyclase / Phosphodiesterase-System, im Gegensatz zu Erythrozyten von Säugetieren. In diesem Reagenzglasversuch wird die Adenylatcyclase-Aktivität durch Substratdruck mit einer (unphysiologisch) hohen ATP-Konzentration erreicht. Diese bewirkt eine cAMP-Syntheserate, die mit der im Organismus durch einen aktivierten Hormon-Rezeptor-Komplex erreichten vergleichbar ist. Das so entstandene cAMP wird aber gleich wieder durch die Phosphodiesterase zu 5'-AMP abgebaut. In diesem Versuch soll die Wirkung des Purinkörpers Theophyllin (1,3-Dimethyl-Xanthin, sehr ähnlich zu Coffein) auf die Phosphodiesterase untersucht werden. Durch eine Hemmung bliebe das cAMP länger erhalten und die Hormonwirkung (hier durch die hohe ATP-Konzentration simuliert) würde verstärkt.

Prinzip der Nachweisreaktion, Bestimmung des 5'-AMP

Das durch die Phosphodiesterase entstandene 5'-AMP tritt nur in sehr geringen Konzentrationen auf. Diese lassen sich jedoch indirekt durch folgenden Mechanismus bestimmen:
Als ein zentrales Enzym im Glykogenabbau unterliegt die Glykogenphosphorylase einer mehrfachen Regulation (siehe Abbildung 4). Auf die aktivierende kovalente Modifikation (Phosphorylierung zu Glykogenphosphorylase a) wurde bereits eingegangen. Eine weitere Regulation der Glykogenphosphorylase b erfolgt durch 5'-AMP, das ein allosterischer Aktivator des Enzyms ist. Da die Aktivierung mit der 5'-AMP-Konzentration korreliert, kann dieser Effekt zur Bestimmung von 5'-AMP eingesetzt werden. **Diese Regulation hat nichts mit der durch cAMP in Gang gesetzten Reaktions-Kaskade zu tun!** Die cAMP-vermittelte Reaktions-Kaskade kann in den Versuchsansätzen nicht erfolgen, da gewaschene Membranen verwendet werden und somit die für die Phosphorylierung notwendigen cytosolischen Enzyme entfernt worden sind.

Unter normalen Bedingungen katalysiert die Glykogenphosphorylase die Hydrolyse von Glykogen zu Glucose-1-phosphat. Bei der Nachweisreaktion wird jedoch durch eine hohe Konzentration von Glucose-l-Phosphat aufgrund des Substratdrucks die Glucose in Glykogen eingebaut. Da eine lineare Kettenverlängerung erfolgt, können Jod-Atome in das neu synthetisierten Glykogen unter Bildung eines braunen Komplexes eingelagert werden. Dieser Komplex hat ein Absorptionsmaximum bei 546 nm hat und somit leicht photometrisch bestimmt werden kann.

Benötigte Lösungen:

HEPES-Puffer		10	mM	N-[2-hydroxyethyl]piperazin-N´-[2-ethansulfon-säure (HEPES)
	+	12	mM	$MgCl_2$, eingestellt auf pH 7,4
ATP-Lösung		1	mM	ATP in HEPES-Puffer
Theophyllin-Lösung		5	mM	Theophyllin in HEPES-Puffer
Glykogenphosphorylase b	ca.	0,5	mg/ml	Enzymprotein in HEPES-Puffer
Phosphorylase-Reagenz		1,35	g	Glucose-1-phosphat
	+	400	mg	Glykogen ad 100 ml H2O, pH 6,1
Jod-Jodkalium-Lösung		100	mg	J_2
	+	200	mg	KJ ad 100 ml HCl, pH 2,0
Erythrocytenmembranen	fertig präparierte und gewaschene Erythrocytenmembranen werden im Eisbad auf jedem Tisch bereitgestellt			

Versuchsdurchführung:

1. Nach folgendem Pipettierschema werden 8 graduierte Kunststoff-Reagenzgläser befüllt (Volumenangaben in µl):

Reagenzglas	1	2	3	4	5	6	7	8
HEPES-Puffer	600	550	500	400	200	-	700	700
Theophyllin	-	50	100	200	400	600	-	-
Membran-Suspension	100	100	100	100	100	100	-	100
Phosphorylase b	100	100	100	100	100	100	100	100

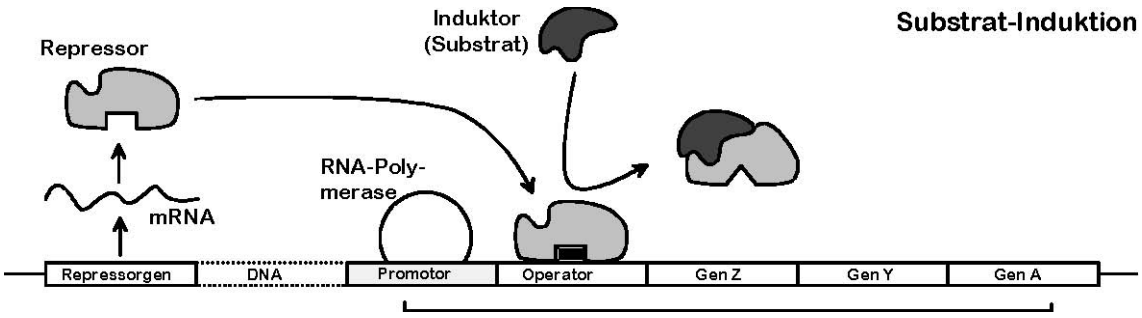
2. In die Röhrchen 1 bis 7 werden dann zum Start der Reaktion je 100µl der ATP-Lösung pipettiert, die Röhrchen mit einem Kunststoffstopfen verschlossen und anschließend gut geschüttelt. In Röhrchen 8 wird keine ATP-Lösung zugesetzt.
3. Für genau 5 Minuten werden die Reagenzgläser im Ständer im Wasserbad bei 37°C inkubiert.
4. Dann werden sofort je 1 ml Phosphorylase-Reagenz zugesetzt, gut geschüttelt und für weitere 15 Minuten bei 37°C inkubiert.
5. 8 frische Kunststoff-Reagenzgläser werden mit je 400 µl Jod-Jodkalium-Lösung befüllt.
6. Die Reagenzgläser im Wasserbad werden herausgenommen und die Membranen sofort in einer Laborzentrifuge für 3 Minuten auf höchster Stufe abzentrifugiert.
7. Anschließend, genau 5 Minuten nach Entnahme der Reagenzgläser aus dem Wasserbad, wird 1 ml des Überstandes in die Reagenzgläser mit der Jod-Jodkalium-Lösung pipettiert.
8. Die Reagenzgläser werden mit dest. H_2O auf genau 10 ml aufgefüllt.
9. Die Extinktion der violetten Farbe wird bei 546 nm im Photometer gemessen. Der dunkelste Messwert sollte dazu eine Extiuktion zwischen 0-1 haben, ist das nicht der Fall sind weitere Verdünnungen notwendig. Als Leerwert dient eine Verdünnung von 400 µl Jod-Jodkalium-Lösung in 10 ml H_2O.

Aufgabe 3 Induktion der β-Galactosidase in *Escherichia coli*

Theoretische Grundlagen

In diesem Versuch soll in einer Bakterienkultur von *Escherichia coli* (*E.coli*, Wildtypstamm K12) die Synthese des Enzyms β-Galactosidase induziert werden. Die von Jacob und Monod zur Regulation der Genexpression entwickelten Vorstellungen sind zwar vereinfacht, vermitteln aber dennoch einen Eindruck davon, welche Mechanismen bei der Aktivierung von Genen durch Hormone oder ihre Folgeprodukte in der Zelle wirksam sein könnten. Bakterien eignen sich für den Versuch besser als Zellen höherer Organismen, da sie eine kurze Generationszeit haben und die Produkte der Genaktivierung leicht zu isolieren sind.

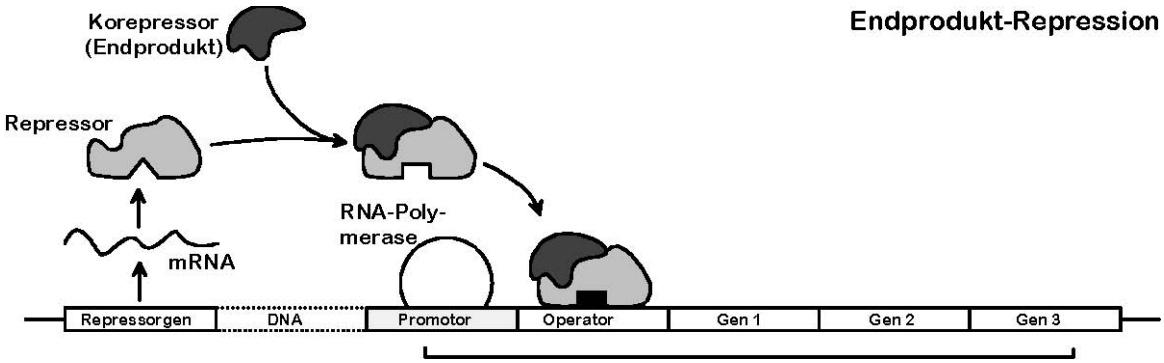
E. coli-Bakterien können mit Lactose als einziger Kohlenstoffquelle wachsen. Dabei wird β-Galactosidase, die die Spaltung von Lactose in Galactose und Glucose katalysiert, zu einem Schlüsselenzym des bakteriellen Stoffwechsels. Wachsen *E. coli* auf anderen C-Quellen, so werden nur sehr wenige Moleküle β-Galactosidase gebildet, während auf Lactose die Synthese des Enzyms (durch die Steigerung der Transkription des β-Galactosidase-Gens) massiv induziert wird. Neben β-Galactosidase benötigt die Bakterienzelle zur Nutzung der Lactose zusätzlich die β -Galactosid-Permease und die β-Galactosid-Transacetylase. Die Information für die Primärstruktur dieser drei Enzyme ist linear in einem Operon auf der DNA angelegt. Bei der Transkription dieser Information durch mRNA-Synthese lagert sich die RNA-Polymerase zunächst an die Promotor-Region an. Die Transkription der Strukturgene Z (β-Galactosidase), Y (β-Galactosid-Permease) und A (β-Galactosid-Transacetylase) durch die RNA-Polymerase kann nur dann beginnen, wenn die Operatorregion frei und nicht durch einen Repressor blockiert ist. Dieses Repressorprotein ist ein Produkt des Regulatorgens und dient der Zelle als Kontrollinstrument bei der Transkription. Die Gesamtheit von Promotorregion, Operatorregion und den Strukturgenen wird als Lac-Operon bezeichnet.



Lac Operon

Ein Repressor hat zwei Bindungsstellen: eine für den Operator und eine andere für den Induktor. Durch die Bindung des Induktors wird die Konformation des Proteins allosterisch so geändert, dass die Affinität zum Operator aufgehoben wird. Der Operator ist jetzt frei und die mRNA kann durch die RNA-Polymerase synthetisiert werden.

Ähnlich wie die beschriebene Substratinduktion des Lac-Operons, die im Praktikum durchgeführt wird, lässt sich auch die Repression anaboler Enzyme durch ihre Syntheseprodukte erklären. Auch hier hat der Repressor zwei Bindungsstellen, von denen diejenige für den Operator jedoch zunächst eine unpassende Konformation besitzt. Häuft sich aber im Stoffwechsel das Endprodukt der enzymatischen Reaktion an, so kann es sich an die zweite Bindungsstelle als Korepressor anlagern. Durch die dadurch induzierte allosterische Umwandlung besitzt der Repressor jetzt die erforderliche Affinität zum Operator und blockiert die Transkription.



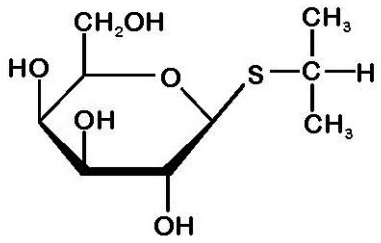
Operon

Diesen Versuch führen 3 oder 4 Praktikanten gemeinsam durch. Dabei muss steril gearbeitet werden, d.h. Gegenstände wie Pipettenspitzen, die mit der Bakteriensuspension in Kontakt kommen, dürfen weder mit den Händen noch mit

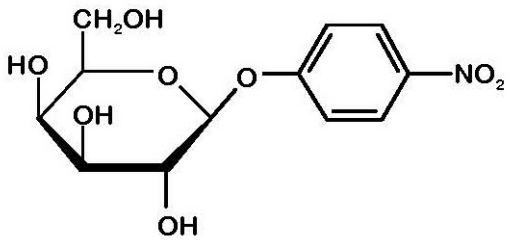
anderen Gegenständen berührt werden. Die Arbeit sollte daher so eingeteilt werden, dass ein Praktikant bei Entnahme von Bakteriensuspension vorsichtig den Stopfen abnimmt, ein anderer die Suspension ohne Berührung der Glasinnenwand mit einer 1000 µl-Eppendorfpipette abpipettiert, ein dritter die optische Dichte der Suspension am Photometer misst und das vorläufige Protokoll führt.

Jede Gruppe bekommt zwei Suspensionen, in denen sich die Bakterien in demselben Lactose-freien Medium befinden. Als Induktor dient nicht Lactose, sondern es wird das in gleicher Weise wirksame Isopropylthio-β-galactosid (IPTG) der einen Suspension zugesetzt (Suspension I). Die andere Bakeriensuspension wird nicht induziert (Suspension N).

Die Aktivität der β-Galactosidase wird durch die enzymatische Spaltung des synthetischen Substrates *p*-Nitrophenyl-β-galactosid (NPG) bestimmt. Dabei entsteht das im alkalischen Carbonat-Puffer gelbe *p*-Nitrophenol, das bei 405 nm im Photometer quantitativ bestimmt werden kann.



Isopropylthiogalactosid (IPTG)



p-Nitrophenylgalactosid (NPG)

Benötigte Lösungen:

Bakteriensuspension	2 x 15 ml *E. coli*-Suspension, angezüchtet in Lactose-freiem Medium
Kulturmedium	
MEA-Puffer (giftig)	25 mM Phosphatpuffer, pH 7,0 + 0,2 % Mercaptoethanol + 0,01 % Natrium Azid
Carbonat-Puffer	1 M Na_2CO_3 in dest. H_2O
IPTG-Lösung	10 mM
NPG-Lösung	5 mM

Versuchsdurchführung:

Vorsicht beim Umgang mit Bakterien (Hände waschen, nicht mit dem Mund pipettieren etc., alle kontaminierten Pipettenspitzen und Röhrchen in die besonderen Behälter)!

Die Bakterienkulturen dürfen nur für die kurze Zeit der Probenentnahme aus dem 37°C-Wasserbad entnommen werden, da sonst das Wachstum der Bakterien unterbrochen wird!

1. Es werden zwei Reihen mit je 7 Plastikreagenzgläsern vorbereitet, die folgendermaßen beschriftet werden:

N (nicht induziert)	N_0	N_{10}	N_{20}	N_{30}	N_{40}	N_{50}	N_{60}
I (induziert)	I_0	I_{10}	I_{20}	I_{30}	I_{40}	I_{50}	I_{60}

2. Jedes Reagenzglas wird mit 1 ml MEA-Puffer (bakterizid) befüllt.
3. Die Erlenmeyerkolben der Bakterienkulturen befinden sich im 37°C-Schüttel-wasserbad. Jede Gruppe beschriftet zwei Kolben mit Tischnummer/Gruppen-bezeichnung sowie mit N oder I.
4. Zwei Kunstoffküvetten werden mit je 0,5 ml H_2O befüllt.
5. Die Stopfen werden vorsichtig abgezogen. Aus den Kolben N und I werden je 1 ml Suspension mit einer Eppendorfpipette ohne Berührung der Innenwand entnommen und in die Röhrchen N_0 bzw. I_0 gegeben (Zeit t = 0). Diese

werden dann später für die unten beschriebene Bestimmung der β-Galactosidase-Aktivität benutzt.

6. Danach entnimmt man je Kolben weitere 0,5 ml und gibt diese in die vorbereiteten zwei Kunststoffküvetten und misst umgehend die optische Dichte wie unten beschrieben (siehe Bestimmung der Bakterienzahl).
7. Jetzt wird nur die Bakterienkultur I mit 1 ml IPTG-Lösung versetzt. Beide Erlenmeyerkolben werden mit den Stopfen verschlossen und wieder in das Schüttelwasserbad bei 37°C gestellt.
8. Die Probennahme von je 1 ml Bakteriensuspension in die Röhrchen $N_{10\text{-}60}$ bzw. $I_{10\text{-}60}$ sowie von je 0,5 ml in Küvetten mit 0,5 ml H_2O zur Bestimmung der Bakteriendichte wird nach 10, 20, 30, 40, 50 und 60 Minuten, wie unter den Punkten 4. bis 6. beschrieben, wiederholt. Der Rest der Kulturen wird schließlich in der bereitstehenden Detergenz Lösung vernichtet.

Bestimmung der Bakterienzahl:

1. Der für die Messung notwendige Leerwert wird aus 0,5 ml Kulturmedium (klar, ohne Bakterien) + 0,5 ml H_2O in einer dritten Küvette angesetzt. Diese Referenzküvette kann für alle Messungen benutzt werden.

2. Zur Messung der optischen Dichte (OD) werden die Küvetten mit den verdünnten Bakteriensuspensionen (0,5 ml H_2O + 0,5 ml Bakteriensuspension) sofort nach Entnahme bei 578 nm vermessen. Die verdünnten Suspensionen werden nach der Messung in die Detergenslösung gegeben.

Eine OD von 1,0 entspricht einer Bakterienzahl von ca. 8×10^8 Bakterien/ml.

Bestimmung der β-Galaktosidase-Aktivität:

1. Nach Entnahme aller Proben in die Röhrchen N_0 - N_{60} und I_0 - I_{60} mit je 1 ml Bakteriensuspension, wird jeweils 1 ml NPG-Lösung zugesetzt.
2. Dann lässt man die enzymatische Reaktion in den Röhrchen unter häufigem Schütteln bei 37°C in den Wasserbädern auf den Labortischen ablaufen, wobei durch die β-Galactosidase das Substrat in *p*-Nitrophenol und Galactose gespalten wird.

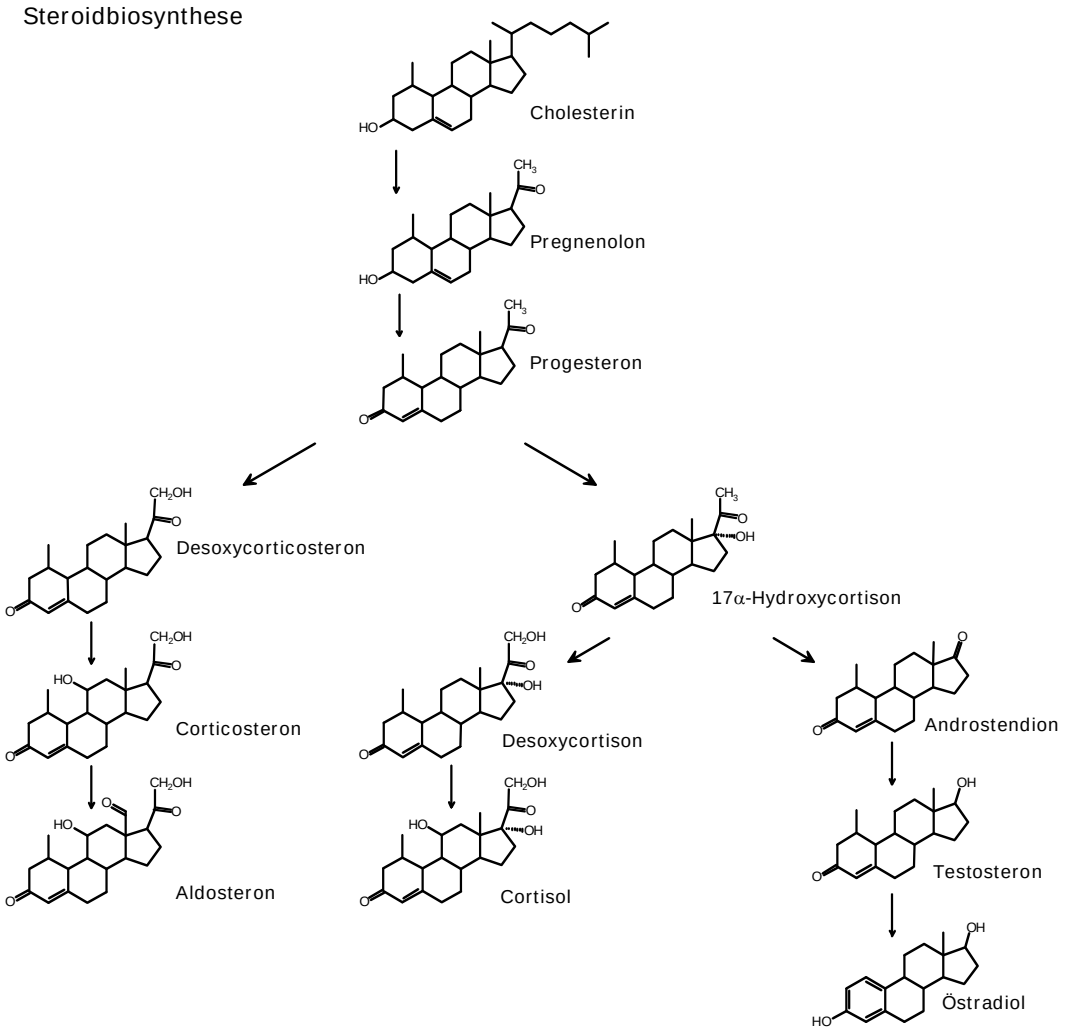
3. Nach 30 Minuten wird die Reaktion durch Zugabe von 2 ml Carbonat-Lösung beendet.
4. Durch 5-minütige Zentrifugation auf höchster Stufe werden die Bakterien abzentrifugiert.
5. 1 ml des klaren Überstands werden in Plastikküvetten gegeben und gegen einen Leerwert bei 405 nm gemessen. Der Leerwert soll 0,5 ml MEA-Puffer, 0,5 ml Kulturmedium (klar, ohne Bakterien), 0,5 ml NPG-Lösung und 1 ml Carbonat-Lösung enthalten und muss vor der Messung gut gemischt werden.

Aufgabe 4 Analyse von Steroidmustern unterschiedlicher Organe

Theoretische Grundlagen

Die Steroidhormone werden aus der Vorstufe Cholesterin in der Nebennierenrinde, im Ovar und in Hoden sowie während der Schwangerschaft in der Plazenta gebildet. Es werden die den Elektrolyt- und Wasserhaushalt regulierende Mineralocorticoide (u.a. Aldosteron, Desoxycorticosteron), die den (Kohlenhydrat-) Stoffwechsel regulierende Glucocorticoide (u.a. Cortisol, Cortison), die zu den männlichen Geschlechtshormonen zählenden Androgene (Testosteron, Androstendion), sowie die weiblichen Geschlechtshormone der Östrogene (Östradiol) und der Gestagene (u.a. Progesteron) unterschieden. Die Synthese der Steroidhormone in Hoden und Ovar steht unter dem stimulierenden Einfluss der hypophysären Hormone LH und FSH, in der Nebennierenrinde unter dem Einfluss von ACTH. In der Nebennierenrinde entstehen dabei hauptsächlich Mineralocorticoide und Glucocorticoide, daneben Gestagene, Östrogene und Androgene. Im Hoden werden über Gestagene als Zwischenstufen vor allem Androgene neben wenig Östrogenen, im Ovar vor allem Östrogene und Gestagene neben geringen Mengen an Androgenen gebildet.

Die folgende Skizze gibt eine Übersicht über die Hauptsynthesewege:



Die Analyse der Steroide soll mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie erfolgen, eines einfachen Verfahrens zur Auftrennung von Gemischen kleinster Substanzmengen. Das Trennprinzip beruht auf Adsorptionsvorgängen an pulverisierten, festen Sorbentien (hier: Kieselgel SiO_2), die in dünner Schicht auf eine Platte (Glasplatte, alternativ auch auf Aluminium- oder Kunststofffolie möglich) aufgetragen sind. Steht ein solches Adsorbens mit der Lösung einer Substanz in Berührung, so kommt es zur Adsorption der Moleküle an dessen Oberfläche. Dabei ist die Affinität des polar aufgebauten Kieselgels zu polaren Substanzen besonders groß, so dass polare Moleküle besser an der Oberfläche haften als unpolare. Wird ein Substanzgemisch am unteren Ende der Platte aufgetragen und die Platte daraufhin in ein mehr oder weniger unpolares Lösungsmittel gestellt, so wird das

Lösungsmittel durch Kapillarkräfte „hochgesogen“ und wandert über die aufgetragenen Substanzen hinweg. Die Moleküle haben dann einerseits die Tendenz, in Lösung zu gehen und mit dem Lösungsmittel zu wandern, werden aber andererseits durch die Adsorptionskräfte an das Adsorbens gebunden. Es bildet sich ein Gleichgewicht zwischen Adsorption und Lösung aus, das bei polaren Substanzen mehr auf Seiten der Adsorption, bei unpolaren mehr auf Seiten der Lösung liegt. Dieses Gleichgewicht stellt sich während der Wanderung des Lösungsmittels unendlich viele Male ein und hat zur Folge, dass polare Moleküle weniger weit wandern als unpolare. Dabei können bereits sehr geringe Unterschiede in den relevanten Eigenschaften zweier Substanzen zu großen Differenzen der Laufstrecken führen.

Das Laufverhalten einer bestimmten Substanz wird durch den R_F-Wert beschrieben. Dieser ergibt sich als Quotient der Entfernung des Substanzfleckes und der Entfernung der Lösungsmittelfront vom jeweiligen Auftragspunkt:

$$R_F = \frac{\text{Wanderungsstrecke der Substanz}}{\text{Wanderungsstrecke des Laufmittels}}$$

Benötigte Materialien:

Dünnschichtplatte	Kieselgel auf Glasplatte
Chromatographietank	als Laufmittel: 6 Teile Chloroform 4 Teile Essigethylester
Auftragsschablone	
Steroidstandard-lösungen (in Chloroform)	1. Corticosteron 2. Cortisol 3. Desoxycorticosteron 4. Aldosteron 5. Östradiol 6. Desoxycortisol 7. Testosteron 8. Androstendion
Gewebeextrakt-lösungen (in Chloroform)	3 Extrakte A, B und C aus Nebenniere, Ovar und Hoden
UV-Lampe	

Versuchsdurchführung:

Plattenvorbereitung*:*

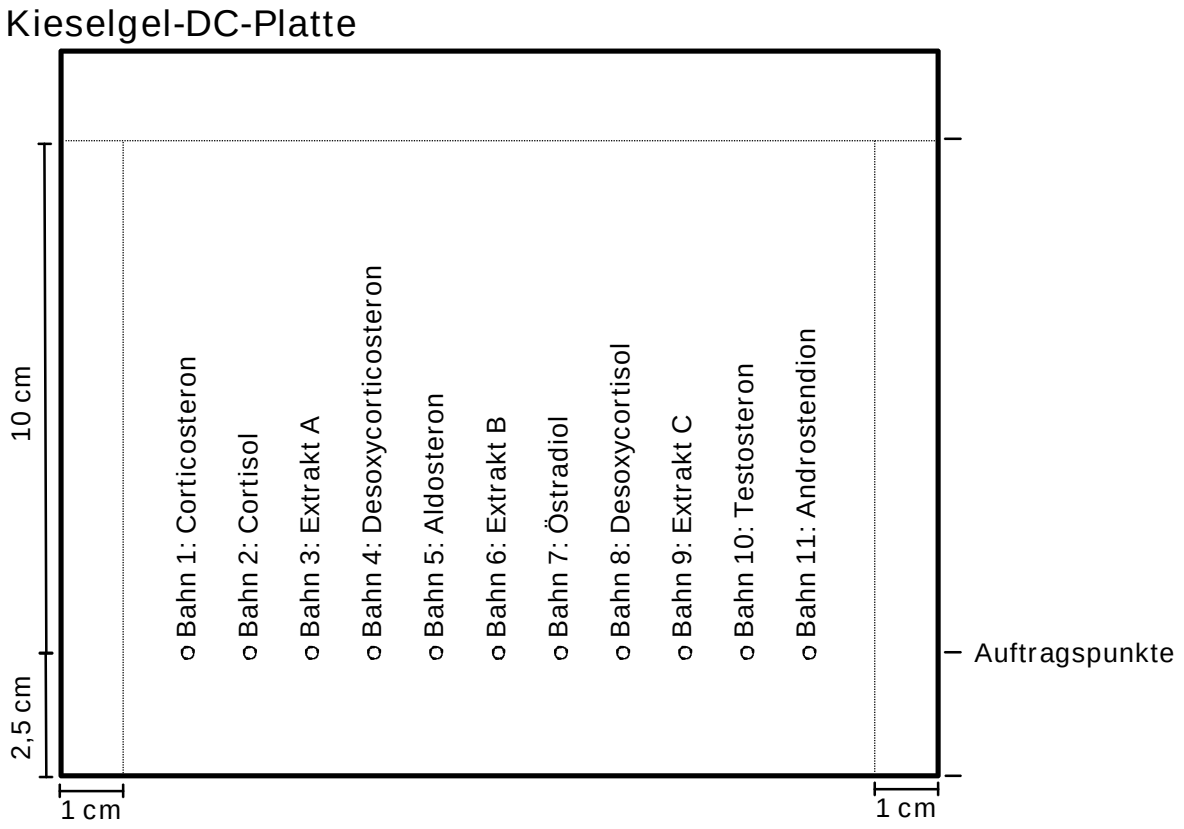
Legen Sie die Platte in die Auftragsschablone, so dass oberer und unterer Rand genau abschließen. Da die Schichtdicke des Kieselgels an den seitlichen Rändern abnimmt, ritzen Sie ca. 1 cm von beiden seitlichen Rändern eine durchgehende senkrechte Linie mit Bleistift in die Kieselgelschicht und legen sodann den Auftragsschlitten mit seinen 11 Einkerbungen über den unteren Rand der Platte. Da die Einkerbungen etwa 2,5 cm vom unteren Rand entfernt sind und die Laufstrecke 10 cm betragen soll, wird mit Hilfe von Bleistift und Lineal eine weitere horizontale Linie etwa 12,5 cm über dem unteren Rand in die Kieselgelschicht geritzt. Auf dem überstehenden Teil können Beschriftungen wie Name, Bahnnummerierung etc. angebracht werden.

Auftragen der Substanzen:

Die Steroidlösungen werden mit Hilfe einer Kapillare aufgetragen. Je Standard- und Gewebeextrakt-Lösung ist eine eigene Kapillare zu verwenden, um eine Kontamination der Lösungen untereinander zu vermeiden. Die Kapillaren befinden sich jeweils in den Röhrchen mit den Lösungen. Nach dem Eintauchen der Kapillare mit Hilfe einer Pinzette in die Standardlösungen der Steroidhormone werden die Kapillaren nur 1 mal kurz in der entsprechenden Kerbe des Auftragsschlittens auf den Startpunkt getippt, wobei der Fleck nicht mehr als 2-3 mm betragen sollte. Ein zu großer Fleck bewirkt eine Vergrößerung während des Laufes, durch die die Substanzen ineinander laufen und die Identifizierung erschweren könnten.

Tragen Sie bitte die Substanzen nach dem unten gezeigten Schema auf.

Bitte die Gefäße sofort wieder schließen!



Entwickeln:

Das Laufmittel ist ein Gemisch aus Chloroform und Essigethylester (6:4). Zur Erzielung einer gleichmäßigen Sättigung der Kammer mit den Dämpfen des Gemisches ist die Innenseite mit Filterpapier belegt. Da die Lösungsmittel unterschiedlich schnell verdampfen, darf der Tank nur ganz kurz zum Einstellen und Herausnehmen der Platte geöffnet werden. Während des Laufes muss die Kammer auf jeden Fall geschlossen sein. Die Platte wird herausgenommen, wenn das Laufmittel die Begrenzung bei 12,5 cm über die gesamte Breite erreicht hat. Keinesfalls darf die Platte länger in der Kammer stehen, da die Flecke sonst durch Diffusion ineinander laufen. Man lässt das Laufmittel an der Luft kurz verdunsten (im Abzug, da Laufmitteldämpfe gesundheitsschädigend sind) und entwickelt ein zweites Mal, indem man die Platte wieder in die Kammer stellt, bis das Laufmittel erneut die Begrenzung bei 12,5 cm erreicht hat.

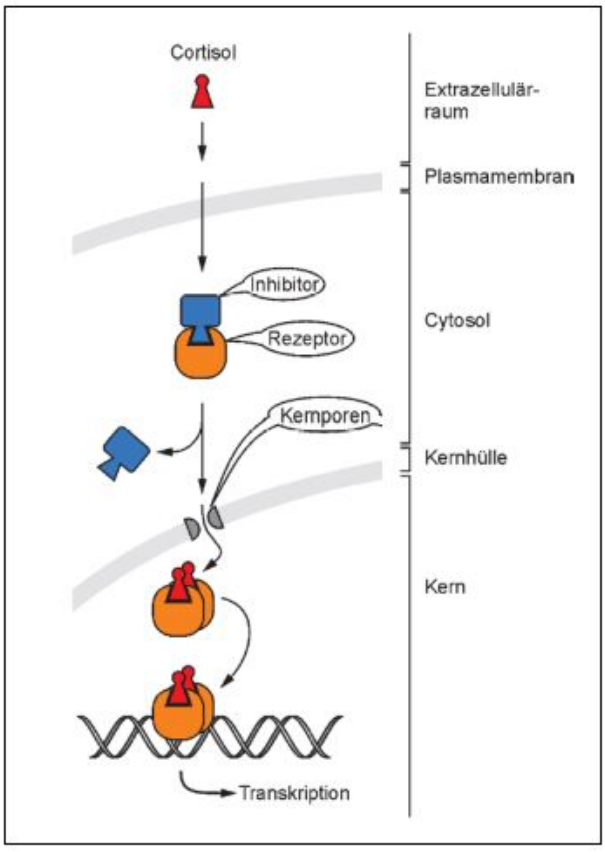
Auswertung:

Zunächst lässt man das Laufmittel wiederum verdunsten und legt die Platte dann in einen abgedunkelten Kasten mit UV-Lampe. Die einzelnen Substanzen können anhand ihrer Lage durch ihre Eigenfluoreszenz bei 254 nm im UV-Licht identifiziert werden. Dabei wird der jeweilige Fleck mit einem Bleistift umrandet.

Aufgabe 5 Untersuchung zur Stimulierung von Zellen durch Mineralocorticoide

Theoretische Grundlagen

Wie bereits in der Einleitung im Abschnitt C erwähnt, kann man Hormone aufgrund ihrer biochemischen Eigenschaften in zwei Gruppen teilen: hydrophile, lipidunlösliche Hormone (Peptidhormone, Proteine, Katecholamine) und lipophile Hormone. Während die erste Gruppe, hydrophile Hormone, ihre Wirkung über Bindung an Membranrezeptoren initiiert, da sie aufgrund ihrer Hydrophilie nicht in die Zelle eindringen können, können lipophile Hormone leicht durch Membranen diffundieren. Nach Interaktion mit cytoplasmatische Rezeptoren wandern die Hormon-Rezeptor-Komplexe in den Zellkern, wo sie als Transkriptionsfaktoren wirken.



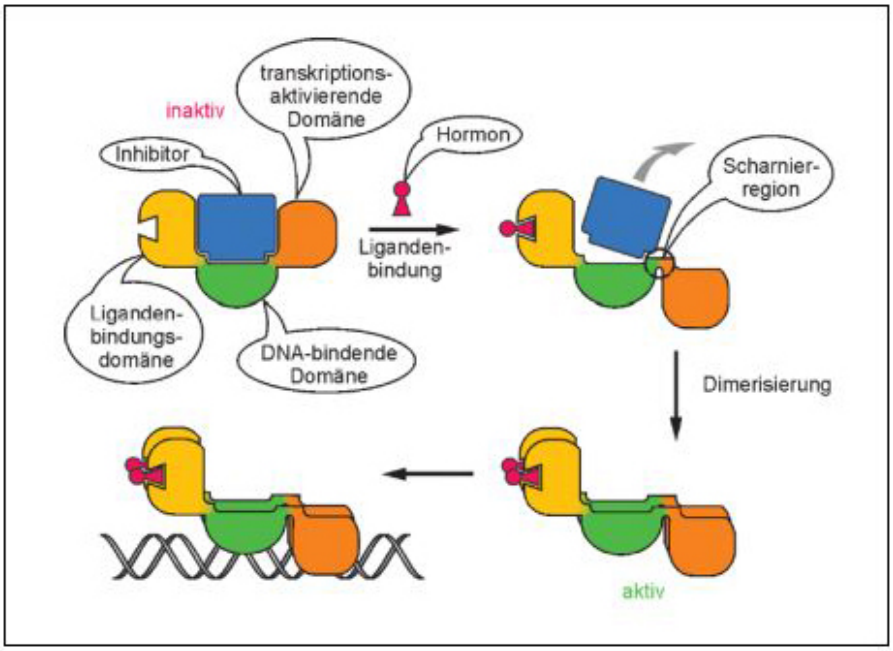
Aktivierung des intrazellulären Cortisol-Rezeptors (Abbildung modifiziert nach Müller-Esterl)

Mineralocorticoide zählen zu den lipophilen Hormonen (Steroide). Sie werden in der Nebennierenrinde gebildet und spielen eine wichtige Rolle im Wasser- und

Mineralhaushalt des Körpers. Typische Vertreter sind: z.B. Aldosteron, Hydrocortisol. In Aufgabe 4 haben Sie sich mit den Hauptsynthesewegen der Steroide beschäftigt. In dieser Aufgabe wird die Funktionsweise der Mineralocorticoide genauer untersucht. Aufgrund ihrer guten Lipidlöslichkeit können Mineralocorticoide leicht durch Zellmembranen diffundieren. Im Cytoplasma angelangt, binden sie an spezifische Rezeptoren und bilden Hormon-Protein-Komplexe. Durch die Hormon-Bindung kommt es zu einer Aktivierung. Diese aktivierten Komplexe können Dimere bilden und weiter in den Zellkern wandern, wo sie durch Bindung an spezifische Bereiche der DNA, die Hormon-Responsiven-Elemente, als Transkriptionsfaktoren wirken, d.h. es kommt zu einer spezifischen Genaktivierung.

Diese Aktivierung von intrazellulären Rezeptoren können Sie in der oberen Abbildung am Beispiel Cortisol verfolgen. Während Aldosteron an den Mineralocorticoidrezeptor bindet, bindet Cortisol hauptsächlich an den Glucocorticoidrezeptor. Der Mechanismus dahinter ist der gleiche. Cortisol diffundiert durch die Membran, bindet im Cytosol an den Rezeptor. Der aktivierte Komplex dimerisiert, transloziert in den Zellkern und bindet dort an Ziel-DNA.

Die folgende Abbildung zeigt die Aktivierung des Rezeptors durch lipophile Hormone im Detail. Rezeptoren für lipophile Hormone besitzen drei charakteristische Bereiche - Eine Ligandenbindungsdomäne, an die das Hormon bindet. - Eine DNA-bindende Domäne die im inaktiven Zustand oft von Inhibitoren besetzt ist. Durch die Bindung eines Hormons kommt es zu einer Konformationsänderung des Rezeptors, Loslösung von Inhibitoren und der Ausbildung von Homo- oder Heterodimeren die sich an spezifische DNA-Sequenzen anlagern können. Ein weiterer wichtiger Bereich ist die Transkriptions-aktivierende Domäne.



Rezeptoraktivierung durch lipophile Hormone (Abbildung nach Müller-Esterl)

Im folgenden Versuch sollen Zellen stimuliert werden, in die ein Mineralocorticoid-Rezeptor-Expressions-Konstrukt eingebracht wurde. Bei diesem Konstrukt handelt es sich um Plasmid-DNA. Wie sie aus vorangegangenen Praktikumsteilen wissen sollten, sind Plasmide kleine, zirkuläre DNA-Moleküle, die relativ einfach manipuliert werden können. Unter einem starken Promotor (CMV-Promotor) wurde in die Multiple-Cloning-Site des Plasmids DNA kloniert, die für einen Mineralocorticoidrezeptor kodiert. Direkt daran gekoppelt ist DNA, die für das Fluoreszenzprotein YFP (Yellow Fluorescence Protein) kodiert. Dadurch kann die Lokalisation des Rezeptors, oder jedes anderen Proteins welches an das YFP fusioniert wurde, innerhalb der Zelle mikroskopisch lokalisiert werden.

Das Einbringen genetischen Materials in eukaryotische Zellen nennt man **Transfektion**. Dies kann auf verschiedene Arten erfolgen:

- chemische Transfektion: dabei wird Fremd-DNA in das Kulturmedium der Zellen zugegeben. Durch Bildung eines Niederschlags aus Kalzium Kristallen (Kalzium Präzipitat Methode) oder durch Aggregation der DNA mit Lipidmolekülen (verschiedene firmeneigene Lipidmischungen unterschiedlicher Hersteller) nehmen die Zellen die DNA auf.

- Elektroporation: durch einen Stromimpuls wird die Zellmembran vorübergehend permeabilisiert.
- virale Infektion: das Transgen wird zunächst in einen rekombinanten Virus eingebaut. Dieser infiziert anschließend aktiv die Zellen. Meist werden dabei die Viren so modifiziert, dass sie zwar das Transgen in die Zielzellen bringen, sich dort aber nicht weiter vermehren können. Retroviren sorgen z.B. für eine effiziente und stabile Integration des Transgens in das Wirtsgenom, während Adenoviren häufig für hohe transiente Expressionsraten verwendet werden.

Bleibt die eingebrachte DNA für einige Tage (bis Wochen) in der Zelle, geht aber mit der Zeit verloren, spricht man von transienter Transfektion. In einem kleinen Bruchteil der Zellen wird die DNA in das Genom der Zelle eingebaut und dann bei jeder Zellteilung mitvermehrt. Dies nennt man dann eine stabile Transfektion. Da dieser Einbau sehr selten ist, verwendet man dazu Selektionsmarker, z.B. ein Resistenzgen gegen bestimmte Antibiotika. Nach Zugabe des Antibiotikums überleben nur jene Zellen, die die DNA in ihr Genom integriert haben.

Im vorliegenden Fall wurden die Zellen transient, chemisch transfiziert. Da die Transfektion selbst aber länger dauert, werden Ihnen schon fertig transfizierte Zellen bereitgestellt.

Im folgenden Versuch soll die Lokalisation des Rezeptors vor und nach Hormonbehandlung mikroskopisch analysiert werden. Als Stimulanz wird das Glucocorticoid Cortisol verwendet. Glucocorticoide sind vorwiegend an der Regulation des Kohlenhydratstoffwechsels und in geringerem Maße an der Regulation des Lipidstoffwechsels beteiligt. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Anpassung des Stoffwechsels unter Stressbedingungen. In großen Dosen wirken sie immunsuppressiv und werden therapeutisch zur Unterdrückung von Immunreaktionen eingesetzt. Cortisol stellt den Hauptvertreter der Glucocorticoide dar. Allerdings kann Cortisol auch an den Mineralocorticoid-Rezeptor binden und diesen aktivieren. Der Rezeptor bindet Cortisol mit fast gleicher Affinität wie das klassische Mineralocorticoid Aldosteron.

Die Plasmahalbwertszeit von zirkulierendem Cortisol beträgt beim Menschen etwa 70 bis 120min. Einen hauptsächlichen Metabolisierungsweg stellt die Oxidation durch die 11ß-Hydroxysteroid-Dehydrogenasen (11ß-HSDs) dar. Das Vorhandensein des Enzyms hat damit eine herausragende Bedeutung für den Salz und Wasserhaushalt sowie für die Blutdruckregulation, da Cortisol mit einer im Vergleich zu Aldosteron etwa hundertfach höheren Plasmakonzentration andernfalls den Mineralocorticoid-Rezeptor nahezu vollständig besetzen würde. Die Ursache der Selektivität des Mineralocorticoid-Rezeptors für Aldosteron liegt damit hauptsächlich in der In-aktivierung des Cortisols in den Mineralocorticoid–Zielzellen.

Benötigte Materialien:

Transfizierte Zellen (cos7 Zellen – transformierte Fibroblasten Zellen aus der Nebennierenrinde Grüner Meerkatzen)

Hormonlösungen: 1) Hydrocortison
2) Insulin
3) Spironolacton (= Mineralkortikoidhemmer)

Versuchsdurchführung:

Die transfizierten Cos7-Zellen befinden sich bereits in 6-Well Zellkulturplatten.
Beschriften Sie vorsichtig die Platten mit einem Edding-Stift (Ansatz 1,2,..) (Beschriftung klein und am Rand, da die Auswertung später mikroskopisch erfolgt!)
Pipettieren Sie schnell und vorsichtig die jeweils angegebenen Mengen der Behandlungslösungen in die jeweiligen Ansätze, verteilen Sie die Lösungen durch leichtes Kreisen der Platte, ohne das Kulturmedium zu verschütten (geschlossene Deckel). Stellen Sie die Platten danach in den Brutschrank bei 37°C und 5%CO_2 zurück.

Ansatz 1: 10µl Lösungsmittel (=Kontrollansatz)
Ansatz 2: 10µl Hydrocortisonlösung
Ansatz 3: 10µl Insulin
Ansatz 4: 10µl Hydrocortisonlosung + 10µl Spironolactonlösung
(= Mineralokortikoidhemmer)

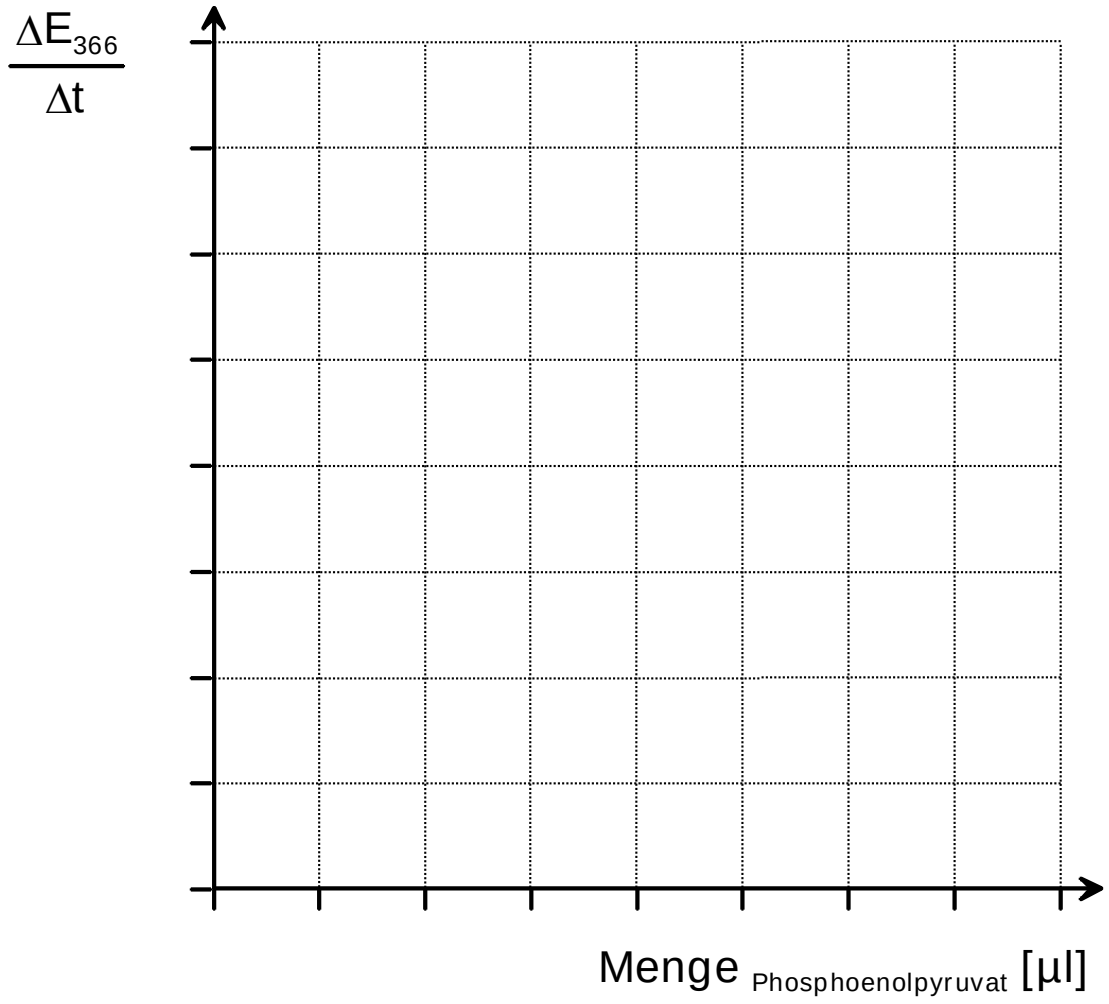
Beobachten Sie die Zellen mikroskopisch (Fluoreszenzmikroskop im Praktikumssaal) ca. 1 Stunde nach Stimulationsbeginn und protokollieren Sie genau Ihre Beobachtungen.

Praktische Aufgaben 1 bis 4

Praktikumsgruppe:
Namen der Praktikanten:

Aufgabe 1:

Die Aktivität der PK ($\Delta E_{366}/\Delta t$) ohne und mit allosterischem Effektor FBP ist als Funktion der PEP-Menge (in µl) in einer Michaelis-Menten-Darstellung aufzutragen.



Wie wirkt der allosterische Effektor bei den verschiedenen Substratkonzentrationen des (PEP)?

Diskussion der Ergebnisse:

.....

.....

.....

Aufgabe 2:

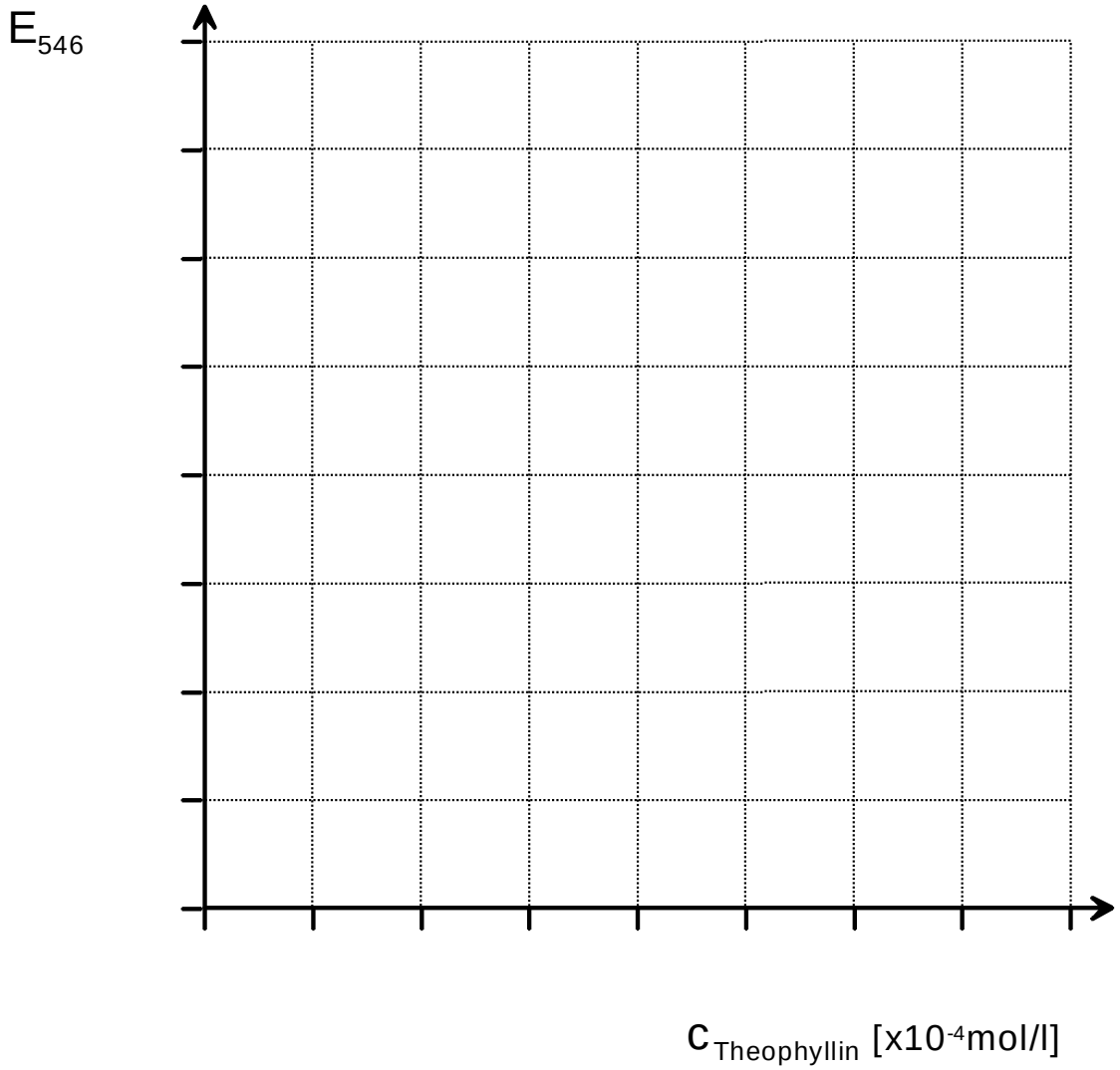
Reagenzglas	1	2	3	4	5	6	7	8
Extinktion								
Theophyllin-Konzentration [mol/l]								

Bitte tragen Sie in einem Diagramm die Extinktion bei 546 nm gegen die Konzentration an Theophyllin für die ersten 6 Reagenzgläser auf. Die Extinktion in Röhrchen 7 gibt Ihnen ein Maß für die Basalreaktion ohne Phosphodiesterase, die im Röhrchen 8 ein Maß für die Basalreaktion ohne ATP.

Konzentrationsberechnung z.B. für 50 µl (Reagenzglas 2):

Ausgangskonzentration 5 mM, Verdünnung auf 900 µl:

$$c_{\text{Theophyllin}} = 5 \cdot 10^{-3} \cdot \frac{50}{900} = 2{,}7 \cdot 10^{-4}\,\text{mol/l}$$



Geben Sie die halbmaximale Hemmkonzentration an. Erklären Sie anhand dieses Versuchs die anregende Wirkung von Kaffee und Tee.

.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....

Aufgabe 3:

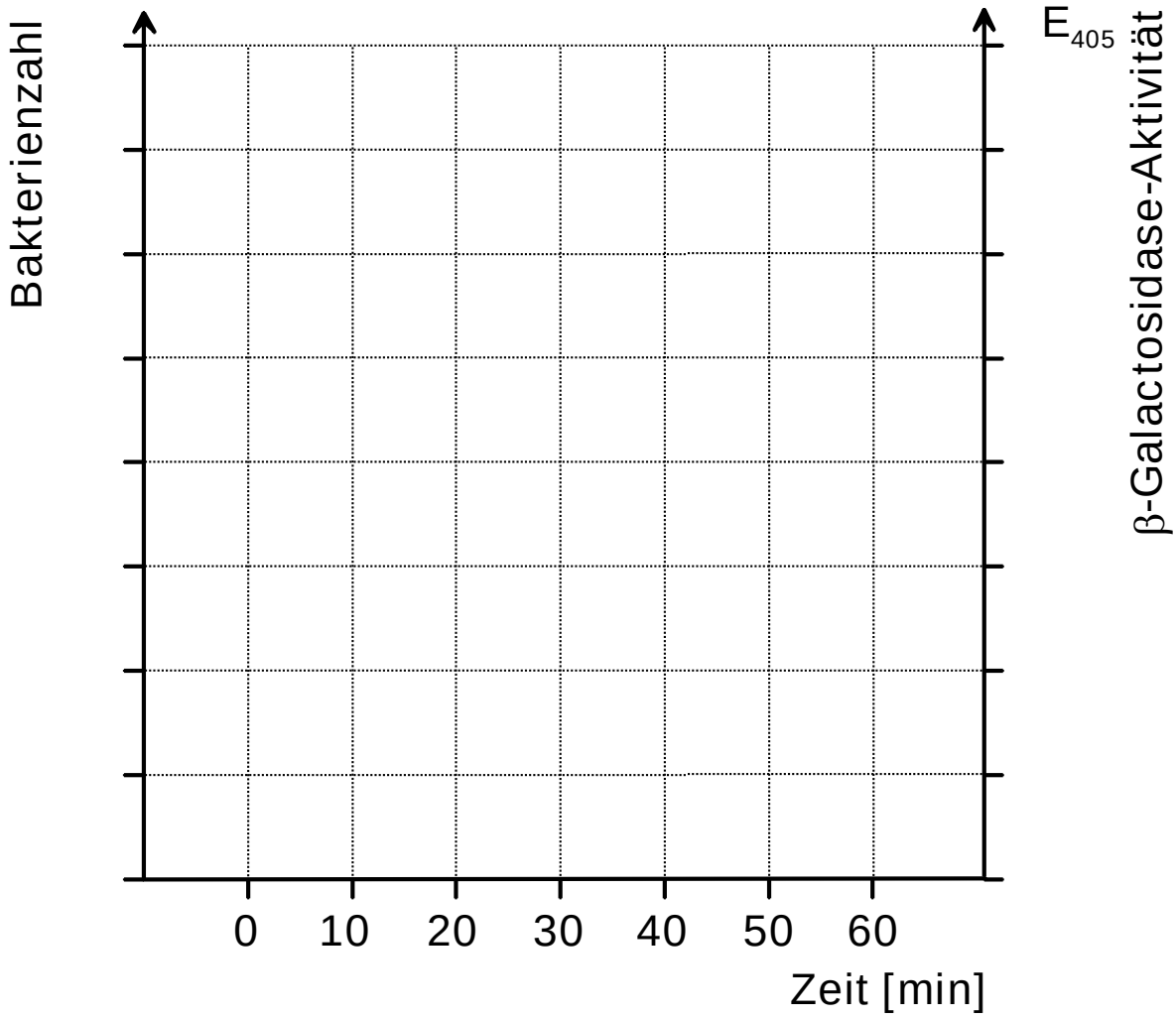
Induziert	0	10	20	30	40	50	60
Extinktion Bakterien							
Bakterien-dichte							
Extinktion □-Galakto-sidase							

nicht induziert	0	10	20	30	40	50	60
Extinktion Bakterien							
Bakterien-dichte							
Extinktion □-Galakto-sidase							

Bestimmen Sie die zeitliche Abhängigkeit des Bakterienwachstums und der Aktivität der β-Galaktosidase nach den entsprechenden Induktionszeiten.

a) Die aus der optischen Dichte bei 578 nm ermittelte Bakterienzahl wird für beide Reihen N und I in einem gemeinsamen Diagramm gegen die Zeit aufgetragen.

b) Die Extinktion des durch die β-Galaktosidase freigesetzten *p*-Nitrophenols als Maß für die Enzymaktivität wird für beide Reihen N und I in einem gemeinsamen Diagramm gegen die Zeit aufgetragen.



Interpretieren Sie das Ergebnis! Welchen Einfluss hat die Induktion auf das Wachstum der Zellen und die Bildung von β-Galactosidase?

.....

.....

.....

.....

.....

.....

Aufgabe 4:

Berechnen Sie bitte die R_F-Werte von:

Cortisol:

Östradiol:

Testosteron:

Geben Sie bitte an, aus welchen Organen die Extrakte A, B und C stammen könnten und bezeichnen Sie die Steroide, anhand derer die Identifizierung erfolgte.

Entspricht die Reihenfolge in der Hydrophobie Ihren Erwartungen, wenn Sie die Strukturen der Steroidhormone unter diesem Gesichtspunkt betrachten?

.....

.....

.....

.....

.....

.....

Aufgabe 5:

Beschreiben und interpretieren Sie Ihre Beobachtungen

.....

.....

.....

.....

.....

.....

BIOCHEMISCHES PRAKTIKUM VIII

Biochemie des Immunsystems

Aufgabe 1: **Nachweis einzelner Antikörper-bildender Zellen mittels eines 'Plaque-Tests'**

Aufgabe 2: **Darstellung von Antigenrezeptor-tragenden B-Zellen als Rosetten**

Aufgabe 3: **Agglutinierende Antikörper**

Aufgabe 4: **Bestimmung von Antikörpern mit der ELISA-Technik**

Aufgabe 5: **Phagozytose von GFP-exprimierenden Bakterien durch Makrophagen**

Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
Biochemisches Institut
In der Medizinischen Fakultät
Olshausenstrasse 40, 24098 Kiel

Stichworte

- Primäre und sekundäre Lymphorgane
- zelluläre und humorale Immunität
- somatische Rekombination und klonale Selektion
- Antigene, antigene Determinante, Epitop, Hapten, Immunogenität, Adjuvantien
- Monozyten / Makrophagen
  Antigen-verarbeitende / prozessierende Zellen und Antigen-präsentierende Zellen bei der Induktion einer Immunantwort; Effektorzellen für die humorale Immunität (exprimieren Fc- und C´-Rezeptoren)
- Dendritische Zellen
  professionelle Antigen-verarbeitende / prozessierende Zellen und professionelle Antigen-präsentierende Zellen bei der Induktion einer Immunantwort
- B-Lymphozyten:
  Struktur der Antikörper: H- und L-Ketten, variable und konstante Regionen, hypervariable Regionen, F(ab), $F(ab)_2$, Fc, Isotypen: Klassen, Subklassen, Typen
  Antikörpergene: V/J/C für L-, V/D/J/C für H-Kette, Größe des Repertoires, somatische Mutation
  Funktion von Antikörpern: neutralisierende Ak, Phagozytose, Komplement-Aktivierung: Funktion des C´
  Monoklonale Antikörper: Präzipitation
  Agglutination: Prozonen-Phänomen
  ELISA
- T-Lymphozyten:
  Subpopulationen der T-Lymphozyten: T-Helfer (T_H), Regulatorische T-Zellen (T_{Reg}), zytotoxische (T_C), T-Lymphozyten Antigenerkennungskomplex (TCR) für T_H, T_{Reg} und T_C, d.h. Restriktion der Antigenerkennung durch T_H-, $T_{C/Reg}$-Zellen;
- MHC-Moleküle: (`***m****ajor* ***h****istocompatibility* ***c****omplex´)*
  Klasse I- und Klasse II-Moleküle und ihre Funktion

Einleitung

Zellen des Immunsystems

Die Zellen des Immunsystems (IS) sind die *Leukozyten*: Granulozyten, Monozyten, dendritische Zellen, die verschiedenen Gewebsmakrophagen und die Lymphozyten. Die Gesamtheit dieser Zellen ist für die spezifischen und unspezifischen Leistungen des IS verantwortlich. Spezifisch können nur die *Lymphozyten* reagieren, denn sie besitzen auf ihrer Zellmembran entsprechende Rezeptoren; die anderen Leukozyten sind relativ unspezifisch, können aber mit den Lymphozyten in verschiedener Weise interagieren. Als System sichern die Zellen die beiden Aufgaben des IS:

1.) Schutz des *Selbst* gegen mikrobielle Infektionen (Viren, Bakterien, niedere Pilze) und
2.) Bewahrung des *Selbst* gegen innere Veränderungen (Verhinderung der Entstehung von Tumoren).

Das bedeutet, dass die spezifischen Zellen - also die Lymphozyten - das *Selbst* vom *Nicht-Selbst* unterscheiden müssen. Sie können dies aber nicht aus genetisch festgelegten Gründen, sondern sie lernen es im Laufe ihrer Entstehung, d.h. sie lernen die *Auto-Toleranz*.

Die Leukozyten entstehen aus einer gemeinsamen, sog. *pluripotenten Stammzelle* des Knochenmarks und differenzieren dann durch den Einfluss von verschiedenen Wachstumsfaktoren zu den jeweiligen auf ihre Funktion spezialisierten Zellen. Dabei können drei Differenzierungstypen unterschieden werden: Während Granulozyten einfach zu solchen, nicht weiter zu beeinflussenden *Effektorzellen* werden, können Makrophagen und dendritische Zellen unter dem Einfluss von Mediatoren der Lymphozyten ein *Aktivierungsstadium* erreichen. Lymphozyten reifen in speziellen Organen, den *primären Lymphorganen*, zu *immunkompetenten Zellen* heran. Danach können sie Fremdstoffe (Bakterien oder virusinfizierte Zellen; s.o.) erkennen und werden durch diese weiter zu einem *Effektorzellstadium* aktiviert.

Im *primären Lymphorgan* *Thymus* reifen Zellen heran, die Fremdstoffe nur in besonderer Weise, nämlich in Assoziation mit den eigenen Gewebsantigenen (MHC, s.u.) erkennen. Da diese Zellen vom Thymus stammen, werden sie *T-Lymphozyten* oder *T-Zellen* genannt. Die T-Zellen verlassen den Thymus und besiedeln über den Blutstrom die *sekundären Lymphorgane* wie Lymphknoten, Peyer´sche Plaques,

Tonsillen, Milz. T-Zellen sind für die *zelluläre Immunität* verantwortlich, d.h. nach Aktivierung sind sie selbst als *Effektorzellen* wirksam, können beispielsweise virus-infizierte eigene Zellen erkennen und abtöten.

Das andere primäre Lymphorgan ist bei Vögeln die *Bursa fabricii*; bei Säugetieren wird die Funktion der Bursa in der frühen Ontogenese von der *fetalen Leber* und später vom *Knochenmark* selbst wahrgenommen. Die dort differenzierenden Zellen leiten sich also von der Bursa oder vom Knochenmark (engl. *Bone marrow*) ab und heißen deshalb *B-Lymphozyten* oder *B-Zellen*. Während der Differenzierung im primären Lymphorgan erhalten sie einen Rezeptor, mit denen sie Fremdstoffe direkt erkennen können. Diese Rezeptoren sind die *Immunglobuline = Antikörper*. Wenn die B-Zellen im primären Lymphorgan ihre *Immunkompetenz* erlangt haben, besiedeln sie ebenfalls die sekundären Lymphorgane.

Die Substanzen, die Lymphozyten aktivieren können, nennt man *Antigene*. Dies sind in der Regel hochmolekulare Stoffe. Der Teil eines solchen Moleküls, der direkt vom Antigenrezeptor erkannt wird, heißt *antigene Determinante* oder *Epitop*; der erkennende Teil des Antikörpers heißt *Paratop*. Die Stärke, mit der ein Antigen eine *Immunantwort* induziert, bezeichnet man als *Immunogenität*. Ein Antigen kann also ein starkes oder schwaches *Immunogen* sein.

Die antigenen Determinanten von natürlichen Antigenen kennt man i.d.R. nicht. Die Größe, Beschaffenheit und die Immunogenität von antigenen Determinanten hat man in Modellversuchen aufgeklärt, bei denen man verschiedene kleine Moleküle an *Trägermoleküle* (`*carrier´*) gekoppelt hat. Es wurde ihre Immunogenität untersucht und die *Spezifität* der induzierten Antikörper bestimmt. Eine künstlich gekoppelte antigene Determinante nennt man *Hapten*. Es zeigte sich, daß Haptene allein zwar keine Immunantwort auslösen können, während sie dies nach Kopplung an einen Träger sehr wohl vermögen. Mit graduell veränderten Haptenen konnte man bestimmen, daß Antikörper sehr feine molekulare Unterschiede erkennen können, z.B. ob an einem Phenylring ein Substituent in ortho-, meta- oder para-Stellung gebunden ist.

Wenn B-Lymphozyten durch ein Antigen aktiviert werden, werden sie gleichzeitig zur *Proliferation* angeregt und sie *differenzieren* zu *Plasmazellen*. Diese schütten dann den Antikörper, der sie zur Antigenerkennung befähigte, in großer Menge aus. Das können bis zu 2000 Antikörper pro Sekunde sein! Die *sezernierten Antikörper* zirkulieren mit dem Blut und vermitteln die *humorale Immunität*. Diese wird erreicht,

indem die Antikörper an das Antigen (beispielsweise eine Bakterienzelle) binden und dadurch *sekundäre Effektormechanismen* auslösen. Meistens vermitteln diese den eigentlichen Schutz, nicht die Antikörper allein! Die beiden wichtigsten sekundären Effektormechanismen sind:

1) die *Aktivierung des Komplementsystems*, welches bewirkt, daß das Bakterium lysiert wird, und
2) die Bindung des mit Antikörpern beladenen Antigens an Makrophagen. Dies geschieht über sog. *Fc-Rezeptoren* (das sind Rezeptoren in der Zellmembran für den Fc-Teil eines Antikörpers; s.u.) in der Membran der Makrophagen. Diese können das Antigen dadurch sehr viel effektiver aufnehmen = *phagozytieren* und anschließend unschädlich machen. Da Makrophagen auch Rezeptoren für *Komplementfaktoren* besitzen, wird die Phagozytose von Antigen-Antikörper-Komplexe noch zusätzlich durch Komplementfaktoren gesteigert, die an die Komplexe gebunden sein können.

Die Stärke einer Immunantwort kann unspezifisch auch gegen schwache Immunogene erhöht werden, indem man es mit Zusatzstoffen, sog. *Adjuvantien*, injiziert. Dies nutzt man bei Schutzimpfungen aus, indem der Impfstoff oftmals mit einem Adjuvans verabreicht wird. Solche Adjuvantien können sein: Aluminiumsalze, Lipopolysaccharid von gram-negativen Bakterien, Mineralöl wie beim Freund´schen Adjuvans, u.a.

Somatische Rekombination und Klonale Selektion

Die Antigenrezeptoren entstehen völlig unabhängig von einer späteren Verwendung, d.h. das *Repertoire* - also die Vielfalt der unterschiedlich spezifischen *Antigenrezeptoren* der T- wie der B-Zellen entsteht vor dem Auftauchen von Antigenen durch die *somatische Rekombination*. Daraus ergibt sich, dass ein Antigen nur eine Immunantwort auslösen kann, wenn Zellen mit entsprechenden Rezeptoren vorhanden sind. Die Rezeptor-tragenden Lymphozyten werden gleichsam durch das Antigen ausgewählt, was der Inhalt der *klonalen Selektion* ist. Dies erscheint heute selbstverständlich, während man früher, als man sich nicht vorstellen konnte, dass das Immunsystem eine anscheinend unbegrenzte Anzahl von Antigenen erkennen konnte, noch meinte, dass das Antigen seinen Rezeptor formt und damit passend macht.

Immunantwort

Es gibt Antigene, welche B-Lymphozyten ohne die Mithilfe von T-Zellen aktivieren können und es gibt Antigene, die B-Zellen nur mit Hilfe von T-Zellen aktivieren können. Die ersten sind die *Thymus-unabhängigen* oder `*thymus-independent´ (TI) Antigene* und die zweiten sind die Thymus-abhängigen oder `*thymus-dependent´ (TD) Antigene*. Zu den TI-Antigenen gehören Polysaccharide, während TD-Antigene meistens Proteine sind.

Während die Immunantwort gegen TI-Antigene sowohl nach primärer und auch wiederholter Injektion immer gleich stark ausfällt und nur IgM-Antikörper induziert werden, ist die sekundäre Immunantwort gegen TD-Antigene meistens stärker und länger anhaltend als die Primärantwort, was zeigt, daß das Immunsystem ein *Gedächtnis* hat. Dies beruht auf einer Vermehrung der Zellen des oder der *Zellklone*, die beim Erstkontakt mit dem Antigen aktiviert wurden. Dadurch ist das Prinzip der aktiven Schutzimpfung erklärt.

Während der primären Immunantwort gegen ein TD-Antigen werden in den ersten Tagen, wie bei der TI-Antwort, IgM-Antikörper gebildet; dann findet ein *Klassenwechsel* (engl. `*switch´*) zu einer anderen Immunglobulinklasse (s.u.) - meistens IgG-Antikörpern - statt.

Außerdem zeigt die Immunantwort gegen TD-Antigene eine *Immunreifung*. Darunter versteht man, dass die Antikörper im Laufe der Immunantwort - also nach der primären, sekundären oder tertiären Injektion des Antigens - immer `besser´ auf die antigene Determinante passen, d.h. die *Affinität der Bindung* zwischen Epitop und Paratop steigt und zwar bis zum tausendfachen! Dieses bessere Passen erklärt sich durch die *somatische Mutation* oder, weil diese in einem so starken Maße geschieht, auch *somatische Hypermutation* genannt! Dabei werden in die Gene, welche die variablen Regionen der Antikörper kodieren, Mutationen eingefügt, wodurch sich die Spezifität der Antikörper ändert. Diejenigen B-Zellen, deren Rezeptor durch solche somatischen Mutationen verbessert wird, werden nach der nächsten Injektion des Antigens dieses bevorzugt binden und dadurch bevorzugt und stärker aktiviert werden. Die verschiedenen B-Zellklone *kompetieren* also mit ihren Antikörpern als Antigenrezeptoren um das Antigen.

Monozyten / Makrophagen und dendritische Zellen

Diese Zellen besitzen zwar keine Antigenrezeptoren, sie helfen aber entscheidend beim Start einer Immunantwort mit. Sie können Antigene auch unspezifisch oder mit Hilfe schon vorhandener Antikörper aufnehmen (phagozytieren) und bauen sie ab. Dieser Vorgang wird auch *Prozessieren* oder `*processing´* genannt. Der Abbau bewirkt, daß Proteine in kleine Peptide zerlegt werden. Diese werden an Gewebsantigene der Klasse II gebunden, welche im *Haupthistokompatibilitäts-komplex* (`*major histocompatibility complex´* - *MHC*; beim Menschen humanes Leukozyten Antigen-System (*HLA-System*)) kodiert werden. Mit den MHC II-Molekülen gelangen die antigenen Bruchstücke wieder auf die Zelloberfläche, wo dieser Komplex von T-Zellen erkannt werden kann. Dies zeigt, daß Monozyten / Makrophagen und v.a. die professionellen Antigen-präsentierenden Zellen, die dendritischen Zellen, für die *Induktion einer Immunantwort* gegen TD-Antigene entscheidend wichtig sind, da sie den T-Zellen das Antigen *präsentieren* und sie damit *aktivieren*. Makrophagen haben außerdem eine große Bedeutung als sekundäre Effektorzellen (s.o.).

B-Lymphozyten

Antikörperstruktur

Antikörper (Abb. 1 nächste Seite) bestehen grundsätzlich aus zwei verschiedenen Ketten, einer schweren *H-Kette* (von engl. `*heavy´*) und einer leichten *L-Kette* (von engl. `*light´*). Je eine L-Kette wird durch eine Disulfidbrücke mit der H-Kette verbunden, und beide H-Ketten sind ebenfalls durch eine je nach Klasse (s.u.) unterschiedlichen Zahl von Disulfidbrücken miteinander verbunden. Jede Kette enthält je eine N-terminale *variable* und je eine oder mehrere C-terminale *konstante Regionen* oder *Domänen*: die L-Kette aus den Domänen V_L und C_L, die H-Kette aus V_H und entweder drei oder vier C_H-Regionen, was sich nach der Antikörper- oder *Immunglobulinklasse* richtet. Es gibt die fünf verschiedenen Klassen *IgM, IgG, IgD, IgA* und *IgE*, deren Einteilung sich nach den *konstanten Regionen* der *H-Kette* richtet.

Die H-Ketten selbst werden mit griechischen Buchstaben also μ (my), γ (gamma), δ (delta) α (alpha) und ε (epsilon) bezeichnet. Von IgG und IgA gibt es zusätzlich noch Subklassen. Die konstanten Regionen der L-Ketten werden als *Typen* bezeichnet und kommen entweder als λ (*lambda*) oder κ (*kappa*) vor.

Die Klassen, Subklassen und Typen der Immunglobuline werden zusammen als *Isotypen* bezeichnet.

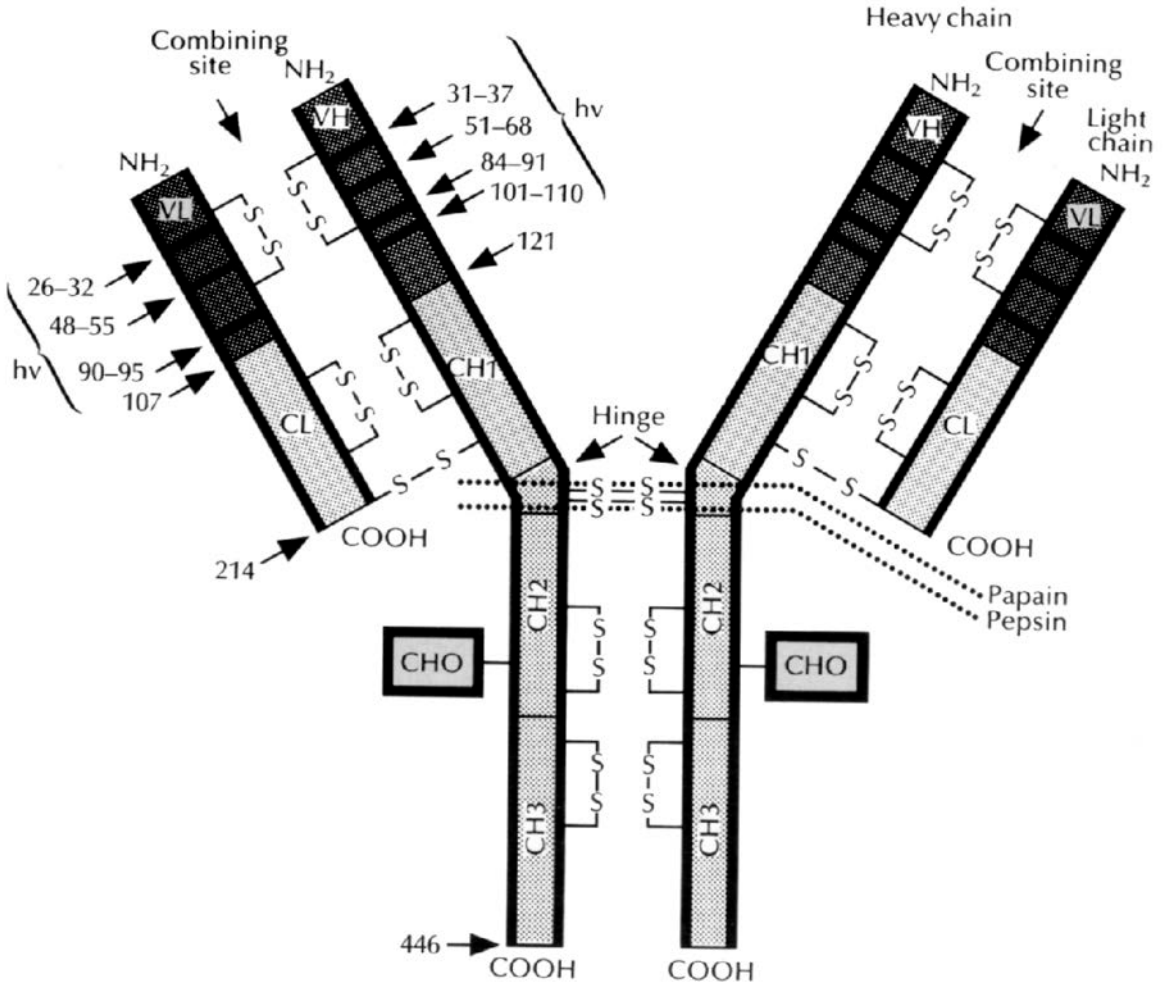


Abb. 1: Diagramm eines menschlichen Immunoglobulin G Moleküls. Die dicken Linien zeigen die Polypetidkette, die dünnen Linien die Positionen der Disulfidbrücken auf. Gestrichelte Linien zeigen die Positionen für enzymatische Spatung an und die Numern geben die Aminosäurest-Position an. C, Konstante Region; CHO, Kohlenhydrat; COOH, Carboxylende; H, Schwere Kette (*heavy chain*); L, Leichte Kette (*light chain*), NH_2, aminoterminales Ende; V, Variable Region.

In den variablen Regionen beider Ketten gibt es je drei *hypervariable* oder auch *CDR* (`*complementarity determining region*´) genannte *Regionen* und zwischen den CDR sind relativ konstante Bereiche. Durch die besondere Sekundärstruktur der Ig-Domänen als doppeltes *β-Faltblatt* und die Assoziation der V_H- mit der V_L-Domäne kommen die CDR beider Ketten in eine Richtung zu liegen und bilden zusammen das

Paratop, welches die antigene Determinante / Epitop bindet. Zwischen der ersten (C_H1) und der zweiten (C_H2) Region der H-Kette befindet sich die *Scharnier*- oder `*hinge´-Region*, welche dem Molekül eine gewisse Flexibilität verleiht, was für die Bindungsmöglichkeiten der Antikörper ans Antigen wichtig ist.

Für die Strukturaufklärung der Antikörper war wichtig, daß man das Molekül enzymatisch in Fragmente zerlegen konnte: *Papain* spaltet die beiden H-Ketten auf der N-terminalen Seite der Disulfidbrücken, welche beide Ketten zusammenhalten; dadurch entstehen 2 *F(ab´)*-Fragmente, die *mono*valent an das Antigen binden können, und 1 *Fc*-Fragment, welches keine Antigenspezifität besitzt.

Pepsin spaltet auf der C-terminalen Seite der Disulfidbrücken, welche die beiden H-Ketten verbinden, und es entsteht dabei 1 *bi*valentes *F(ab´)$_2$*-Fragment und kleinere Bruchstücke des Fc-Teiles des Antikörpers.

Antikörper-Gene

Die konstanten Bereiche der Immunglobuline werden durch je ein Gen pro Klasse bzw. Subklasse und den Typ der L-Kette kodiert. Die variablen Regionen der L-Kette werden durch Gene für etwa die ersten 100 Aminosäuren der variablen Region (*V-Gene*) und Mini-Gensegmente für etwa 10 Aminosäuren, welche die Verbindung zum konstanten Gen (C-Gen) herstellen, und deshalb *J-Gensegmente* (von engl. `*joining´)* genannt werden, kodiert. Die H-Kette wird ebenfalls durch etwa gleich große V-Gene und J-Gensegmente kodiert, zwischen den V- und den J-Genen werden aber zusätzlich Mini-Gensegmente eingefügt, welche die Diversität enorm erhöhen und deshalb *D-Gensegmente* heißen.

Bei der Maus besitzen die meisten Antikörper L-Ketten vom κ-Typ. Für diese existieren im Genom etwa 350 V-Gene und 5 J-Gene, wo denen aber nur 4 benutzt werden können. Daraus errechnet sich, dass es etwa $4 \times 350 = 1400$ Genkombination für κ-L-Ketten gibt.

Für die H-Kette konnten 100-200 V-Gene identifiziert werden, einige Befunde zeigen aber, daß es tatsächlich über 1000 V-Gene sein können. Jedes von ihnen kann mit einem von 30 D-Genen und einem von 6 J-Genen assoziieren. Mit 500 V-Genen würde sich das Repertoire der H-Kette zu $500 \times 30 \times 6 = 90.000$ ergeben. Da man annimmt, daß jede L- mit jeder H-Kette assoziieren kann, beträgt das rechnerische Gesamtrepertoire $(1{,}4 \times 10^3) \times (9 \times 10^4) = 12{,}6 \times 10^7$ oder ca. **10^8 Antikörper mit unterschiedlicher Spezifität.**

Weiterhin kommt hinzu, dass jede Rekombination zwischen V und J der L-Kette und V-D und D-J bei der H-Kette ziemlich ungenau ist. Man schätzt deshalb, dass sich für jede Verbindung das Repertoire um den Faktor 10 erhöht, womit man auf ca. 10^{11} Möglichkeiten kommt.
Wichtig ist zu wissen, dass das rekombinatorische Repertoire - also ohne die somatische Mutation! – bei der Bildung der B-Zellen (und analog für den T-Zell-Rezeptor bei T-Zellen, siehe Vorlesung) entsteht!

Antikörperfunktionen

Die schützende Funktion von Antikörpern beruht darauf, dass sie a) neutralisierend sein können, d.h. Funktionen des Antigens (Toxin, Virus-Anheftung etc.) blockieren b) die Phagozytose fördern (s.o.) und c) Komplement aktivieren (s.o.) können.

Monoklonale Antikörper

Während jeder Immunantwort werden viele B-Zellklone aktiviert und folglich enthält ein Antiserum immer eine Vielzahl von Antikörpern gegen das Antigen, d.h. ein *Antiserum* ist so gut wie immer *polyklonal*. Außerdem ist ein Antiserum grundsätzlich **nicht** für das induzierende Antigen spezifisch! Dies liegt daran, dass einmal bei einer Immunantwort vielfältige Aktivierungen stattfinden und dass zum anderen Antigene oft verwandt sind, sich also in ihrer Molekülstruktur zumindest teilweise ähneln können. Ein Antiserum muss also immer erst durch Absorption spezifisch gemacht werden!
Selbst wenn ein Antiserum dann spezifisch mit seinem Antigen reagiert, stellt es ein einmaliges Gemisch verschiedener Antikörper dar: verschiedene Erkennungsstrukturen (*Idiotypen*), verschiedene Klassen und Subklassen (Isotypen) und verschiedene Typen der L-Ketten. Dies bedeutet, dass ein Antiserum mit keinem zweiten identisch sein kann.
Heute gewinnt man meistens sog. *monoklonale Antikörper*, die zwar auch nicht grundsätzlich spezifisch sind, es werden aber die für das Antigen spezifischen Antikörper selektioniert. Monoklonale Antikörper sind von höchstmöglicher Reinheit und in der Menge und zeitlich unbegrenzt verfügbar. Monoklonale Antikörper gewinnt man von einer *Hybridzellinie* oder *Hybridom*, die durch Fusion von normalen aktivierten Lymphozyten mit einer Tumorzelllinie, welche sich im Plasmazellstadium (*Myelom* oder *Plasmocytom*) befindet, hergestellt wurden. Durch diese Zellfusion

werden die Eigenschaften beider Elternzellen - einmal einen gewünschten Antikörper zu synthetisieren und zum anderen die Fähigkeit potentiell unsterblich zu sein - miteinander verschmolzen.

In der Praxis geschieht folgendes:

Versuchstiere (Mäuse oder Ratten) werden mit einem Antigen immunisiert. Das Antiserum wird aber nur für Kontrollzwecke gewonnen, während für diese Methode die Plasmazellen, welche die Antikörper sezerniert haben, wichtig sind. Sie werden mit Zellen des Maus-Myeloms X63-Ag8.653 fusioniert. (Die Namen von Zelllinien leiten sich von den Experimenten zu ihrer Etablierung ab.) Die Plasmazelle wird also durch die Fusion unsterblich und kann ihren Antikörper unter guten Bedingungen unbegrenzt synthetisieren. Methodisch muss man natürlich dafür sorgen, daß die Myelomzellen selbst nicht weiterwachsen. Dies wird erreicht, indem man das Gemisch der fusionierten Zellen in HAT-Selektionsmedium wachsen lässt. Das ***A*** steht für Aminopterin, welches als Folsäureantagonist den Hauptsyntheseweg der Purin- und Pyrimidin-Nukleotide und damit die DNS-Synthese blockiert. Wenn aber Hypoxanthin (***H***) und Thymidin (***T***) dem Medium zugesetzt werden, können die Zellen einen Nebensyntheseweg benutzen. Sie benötigen dazu die Enzyme Hypoxanthin-Guanosyl-Phosphoribosyl-Transferase (***HGPRT***) für H und Thymidinkinase (***TK***) für T. Da die Myelomzelle HGPRT-negativ ist, kann sie im HAT-Medium nicht wachsen. Die normalen Lymphozyten / Plasmazellen können ebenfalls unter diesen Bedingungen nicht wachsen, denn sonst brauchte man nicht zu fusionieren! Die Hybridzellen werden aber durch die Normalzellen für HGPRT komplettiert und können wachsen. Unter den Hybridomen werden diejenigen durch geeignete Tests bestimmt, welche für das jeweilige Problem den geeignetsten Antikörper synthetisieren. Diese Hybridzell-linie wird kloniert, zur Antikörper-Produktion eingesetzt, für eine dauerhafte Aufbe-wahrung eingefroren und in flüssigem Stickstoff gelagert.

In den Versuchen sollen Sie einige Reaktionsmöglichkeiten von Antikörpern am Beispiel von monoklonalen Antikörpern gegen Schaferythrozyten (SRBC) kennenlernen.

Nachweisreaktionen für Antikörper

Die Prinzipien der durchzuführenden Teste sind folgende: Antikörper verbinden sich mit ihrem Antigen, und dies kann zu sichtbaren Erscheinungen führen. Ein *lösliches Antigen* kann dadurch ausgefällt werden, d.h. es entsteht eine Trübung, was man als

ein *Präzipitat* bezeichnet; die Reaktion heißt dementsprechend *Präzipitation*. Zelluläre Antigene können vernetzt (z.T. auch ‚verklumpt' genannt) werden, was man als *Agglutination* bezeichnet. Bei beiden Reaktionen kann es bei Überschuss eines der Reaktionspartner zum Ausbleiben der Reaktion kommen; man spricht dann von einer *Prozone*. Deshalb müssen grundsätzlich alle Reaktionen mit abgestuften Konzentrationen einer Verdünnungsreihe (meistens des Antikörpers) untersucht werden. Die höchste Verdünnungsstufe, die noch eine positive Reaktion erkennen lässt, nennt man den *Titer* des Antiserums bzw. des monoklonalen Antikörpers. Eine Titerangabe ist also immer eine Verdünnungsangabe (z.B. 1:128) oder dessen reziproker Wert von 128. Ein moderne empfindliche Nachweisreaktion für Antikörper bzw. Antigen ist der ELISA (`*enzyme-linked immuno sorbent assay*´), bei dem der sekundäre Antikörper mit einem Enzym gekoppelt ist. Die Umsetzung eines Substrates führt dann bei all diesen Testen zur Bildung eines farbigen Produktes, welches einfach visuell oder auch photometrisch bestimmt werden kann. Dies sind nur Beispiele; es können sehr viel kompliziertere Versuche in Form eines ELISA durchgeführt werden.

T-Lymphozyten

T-Lymphozyten sind durch den *T-Zell-Rezeptor/CD3* genannten *Molekülkomplex* gekennzeichnet, welcher für die Aktivierung der Zellen nach Erkennung des Antigens (s.u.) entscheidend ist.

T-Zellen haben zwei prinzipiell verschiedene Aufgaben: entweder sie wirken regulierend auf B-Zellen und andere T-Zellen oder sie erkennen veränderte eigene Zellen.

Die T-Zellen, welche B-Zellfunktionen regulieren, können einmal Helferfunktion haben (*T-Helferzellen-T_H*), oder sie können die Aktivierung von B-Zellen unterdrücken (Regulatorische T-Zellen T_{Reg} ; früher auch T-Suppressorzellen genannt T_s); diese Wirkung ist aber indirekt und läuft über die Suppression der T_H! Die T_H-Zellen tragen als charakteristischen Marker das *CD4* genannte Membranmolekül, während die heterogene Gruppe von T_{Reg}-Zellen verschiedene Oberflächenproteine tragen kann (je nach Untergruppe).

Außer diesen regulatorischen T-Zellen gibt es T-Zellen, welche die *zelluläre Effektorfunktion* ausüben, die also *zytotoxisch* wirken, da sie beispielsweise

veränderte eigene Zellen erkennen, die mit einem Virus infiziert sind. Diese T-Zellen tragen ebenfalls den *CD8* Marker werden als *zytotoxische T-Zellen* (T_C) bezeichnet.
T-Zellen erkennen das Antigen als solches also **nicht (!)**, sondern **nur** wenn dieses *prozessiert* also *verarbeitet* wurde und Teilstücke des Antigens (Peptide) von den prozessierenden Zellen präsentiert werden (s.o.). Dieses sind demnach die *antigen-präsentierenden Zellen* (`*antigen-processing cells´ - APC*). Zu diesen gehören v.a. Monozyten/Makrophagen und dendritische Zellen aber auch B-Zellen. Die Reaktionsfähigkeit von T-Lymphozyten ist also eingeschränkt oder *restringiert*.
Die Funktion der T-Helferzellen ist dabei durch *MHC Klasse II-Moleküle* restringiert, d.h. sie erkennen antigene Peptide, wenn diese an MHC II gebunden sind.
Die Funktion der T-Suppressorzellen (T_S) bzw. zytotoxischen T-Zellen (T_C) ist dagegen durch *MHC Klasse I-Moleküle* restringiert, d.h. sie erkennen antigene Peptide, wenn diese nach dem Prozessieren durch MHC I präsentiert werden.
Diese Zusammenhänge sind in Abb. 2 schematisch gezeigt. Es ist zu sehen, dass dabei das CD4 Molekül als Rezeptor für MHC II und das CD8 Molekül als Rezeptor für MHC I fungiert.

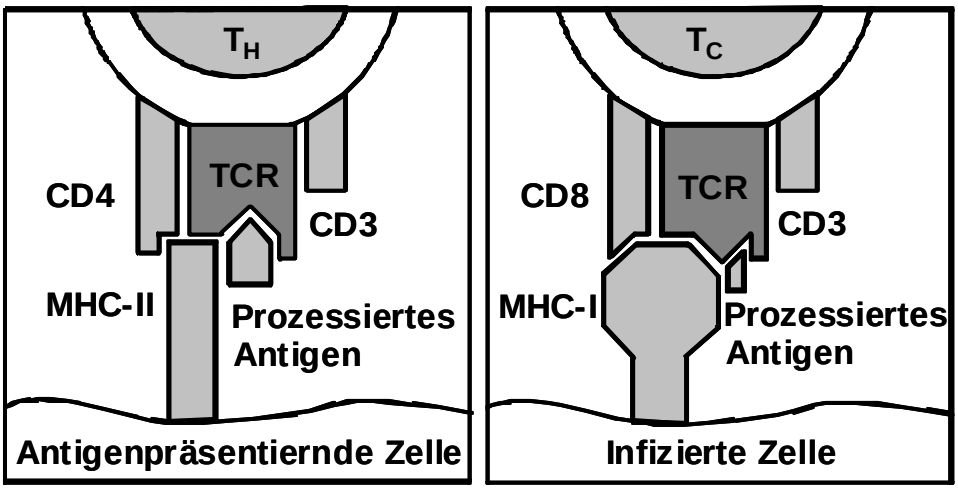


Abb. 2: Erkennung von Antigen-MHC-Protein-Komplexen durch T-Zellen. Die Rezeptoren von T-Helferzellen (T_H) binden mit Unterstützung von CD4 (und CD3) an antigenpräsentierende MHC-II-Proteine von Zellen, die exogenes Antigen durch Endozytose aufgenommen haben. Die T-Zell-Rezeptoren zytotoxischer Zellen (T_C) erkennen zusammen mit CD8 (und Stabilisierung durch CD3) antigenpräsentierende MHC-I-Proteine auf infizierten Zellen, die das entsprechende Antigen somit selbst (endogen) produzieren.

Aufgabe 1 Nachweis einzelner Antikörper-bildender Zellen mittels eines 'Plaque-Tests

Prinzip: Mäuse wurden mit Schaferythrozyten (sheep red blood cells = SRBC) immunisiert. Die Milzzellen dieser Mäuse, von denen ein Teil Antikörper gegen SRBC produziert hatten, wurden mit einer Myelomzellinie fusioniert. Die entstehenden Zelllinien = Hybridome wurden auf Antikörperbildung gegen SRBC getestet. Solche Hybridome sezernieren monoklonale Antikörper (s.u.).
Die Hybridomzellen werden in diesem Versuch mit dem Antigen gemischt und in Kammern gefüllt. Während einer anschließenden Inkubationszeit geben die Hybridomzellen die synthetisierten Antikörper in die Umgebung ab. Die in der unmittelbaren Nähe dieser Zellen liegenden SRBC werden mit den Ak 'beladen' (sensibilisiert). Erst in Anwesenheit von Komplement tritt Lysis der SRBC auf (Hämolyse), wobei ein 'Loch' oder 'plaque' in der roten Erythrozytenschicht rund um die einzelnen Ak- bildenden Zellen (plaque forming cells, PFC) entsteht.
Die in dieser Weise sichtbar gemachten Ak-sezernierenden Zellen scheiden Immunglobuline der Klasse IgM aus (s.S. 9.5). Man spricht in diesem Fall von 'direkten PFCs'. IgG-, und jede andere Klasse von Ig-sezernierenden Zellen, kann man erst durch die zusätzliche Zugabe von Anti-Ig-Antikörpern sichtbar machen. Diese verstärken die lytische Reaktion der Ak-beladenen Erythrozyten, die sonst nicht lysiert werden ('indirekte PFCs').

Direkter PFC-Test (je Gruppe von 2 Studenten)

1. 2 Röhrchen (1,5 ml Reaktionsgefäße = „Eppi“) mit 0,5 ml Puffer (BSS=balanced salt solution [50 ml. Röhrchen]) in Eis und auch weiter dort belassen,
2. in jedes Röhrchen je 50 µl einer 1:4 verdünnten SRBC-Suspension („25%“ rote Lösung im 1,5 ml Eppi) zufügen,
3. in ein Röhrchen 20 µl Hybridomzellen „F2“ (⇒ macht Ak3), in das andere Röhrchen 20 µl Hybridomzellen „SP2“ (⇒ macht Ak4) geben, (entsprechend beschriften!)
4. in jedes Röhrchen je 50 µl Komplement („C“, aus verdünntem Meerschweinchenserum) zufügen,

5. aus dem Eisbad nehmen, gut mischen und jeweils 100 µl mit Eppendorf-Pipette in Kammern füllen, die aus zwei an den Querseiten mit doppelseitigem Klebeband verbundenen Objektträgern bestehen,
6. die Längsseiten der Kammern werden mit Paraffin (unter dem Abzug) verschlossen,
7. bei 37°C 1-2 Stunden inkubieren,
8. Auswertung unter Mikroskop.

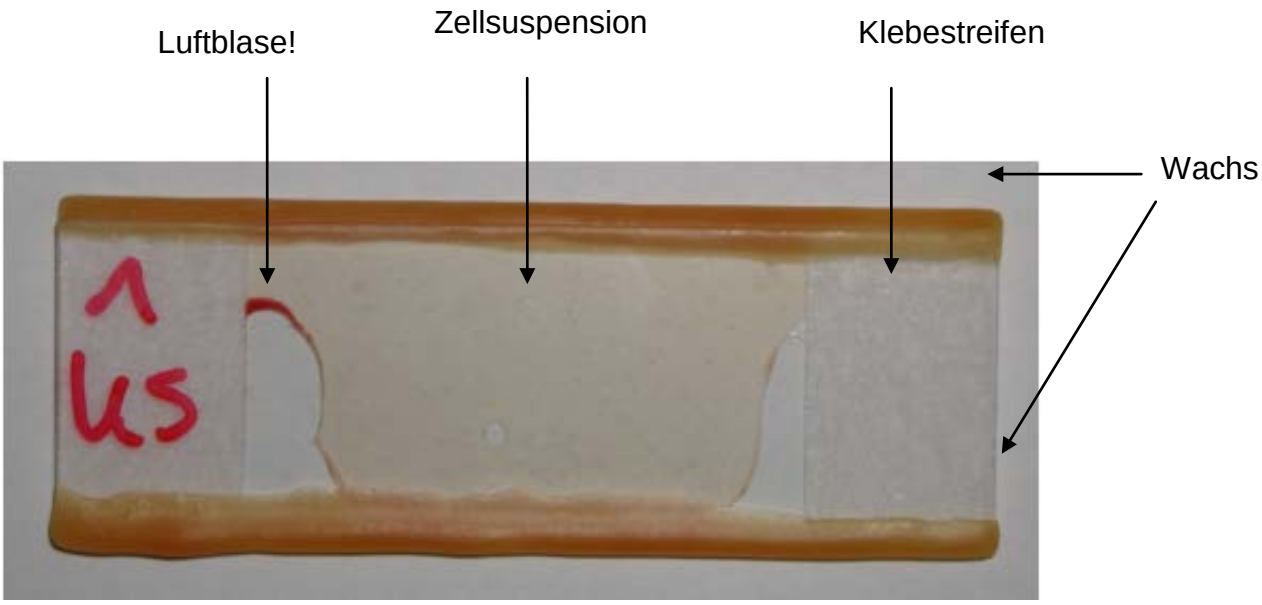


Abb. 3: Beispiel für eine befüllte Kammer.

Aufgabe 2 Darstellung von Antigenrezeptor-tragenden B-Zellen als Rosetten

Wie oben erwähnt besitzen B-Lymphozyten einen Antikörper als Antigenrezeptor präformiert (d.h. ohne jeden Einfluss des Antigens) auf der Zellmembran. Solche antigenbindenden Zellen sind in einem experimentell nicht mit Ag stimulierten Tier nur zu einem sehr geringen Prozentsatz vorhanden. Von den Milzzellen der Maus (siehe Aufgabe 1) sind es vor der Immunisierung z.B. nur 0,001 bis 0,005%; für die meisten anderen Antigene sind es weniger. Der Anteil dieser antigenbindenden Zellen nimmt im immunisierten Tier stark zu. Sie können mit einem Rosettentest nachgewiesen werden. Hydridomzellen befinden sich im Stadium von Plasmazellen, bei welchen eigentlich kein membranständiger Antikörper nachweisbar ist. Dies gilt für die IgM-sezernierenden Hybridomzellen. Dagegen können Hybridomzellen, welche Antikörper der Klasse IgG (hier anti-SRBC) sezernieren, mit ihrem Antigen (SRBC) Rosetten bilden. Dazu werden die Hybridomzellen mit einer 10 bis 20-fach höheren Konzentration an SRBC gemischt.

Pipettierschema:

- 30 µl SP2-HL-Zellsuspension („SP2) in 1,5 ml Reaktionsgefäß („Eppis“) vorlegen
- + 30 µl 1% SRBC-Suspension
- + 200 µl BSS
- vorsichtig mischen, bei 1200 rpm 1 min zentrifugieren (auf Gegengewicht achten!), Überstand abnehmen und verwerfen

Das Pellet in 100 µl BSS **vorsichtig** resuspendieren (**abgeschnittene Pipettenspitzen** verwenden!) und Zellsuspension **vorsichtig** auf Objektträger pipettieren, mit Deckgläschen abdecken (**nicht** auf die doppelten Objektträger mit Klebeband aus Versuch 1!) und mikroskopisch beurteilen

Aufgabe 3 Agglutinierende Antikörper

Antikörper besitzen also zwei oder mehr Valenzen, mit denen sie an ihr Ag binden können. Da Antigene, seien sie lösliche Moleküle oder Zellen, ebenfalls in der Regel multivalent sind, können sie sich mit Ak zu Strukturen höherer Ordnung zusammenlagern. Die Reaktion von löslichem Ag mit Ak führt zur Präzipitation. Handelt es sich um ein zelluläres Antigen, führt die Reaktion mit einem Antiserum zu einer Vernetzung = Agglutination der Zellen Sowohl bei der Präzipitation, als auch der Agglutination, wird das Phänomen der Prozone beobachtet, d.h. im Überschuss des Antikörpers kommt es nicht zur Präzipitat-Bildung. (Finden Sie eine Erklärung!)

Die Menge eines Ak in einem Antiserum wird meistens relativ angegeben. Das Antiserum wird verdünnt, und jede Verdünnungsstufe lässt man mit einer konstanten Menge Ag reagieren. Die höchste Verdünnungsstufe, bei der noch eine Reaktion zu beobachten ist, gibt den Ak-Titer eines Antiserums an.

In dieser und der folgenden Aufgabe werden – neben Antikörpern gegen SRBC – monoklonale Antikörper (mon Ak) gegen das Hapten Fluoreszein-Isothiocyanat (FITC) eingesetzt. Diese Hybridome wurden hergestellt, indem Mäuse mit humanem Immunglobulin (ein starkes Immunogen) immunisiert wurden, an welches FITC gekoppelt worden war. Die Lymphozyten dieser Mäuse wurden fusioniert, und die entstandenen Hybridome wurden auf Antikörperbildung gegen FITC getestet, d.h. Positivität für FITC-BSA (bovines Serumalbumin) und Negativität für BSA allein.

Material:

- BSS ("balanced salt solution" in 50 ml Röhrchen),
- Kulturüberstände monAK 1 (roter Punkt), 2 (blauer Punkt), 3 (grüner Punkt) bzw. 4 (schwarzer Punkt) produzierender Hybridomzellen
- 1%-ige Suspensionen von FITC-SRBC und SRBC (in 15 ml Röhrchen),
- Rundboden-Mikrotiter-Platten, Röhrchen, Eppendorf-Pipetten.

Methode:

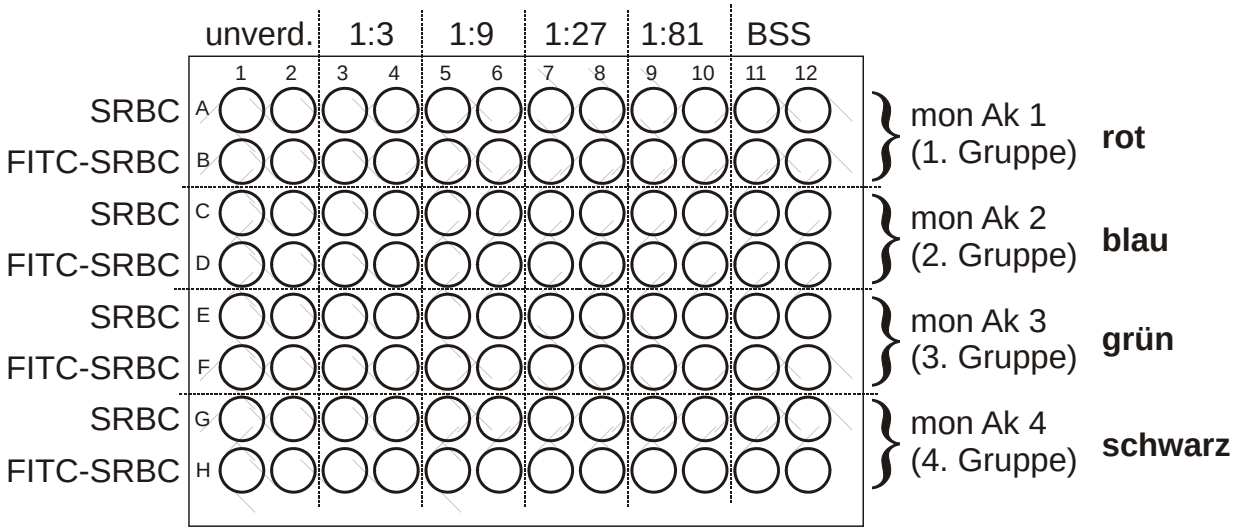
(pro Zweiergruppe soll **ein** mon.Ak getestet werden)

- stellen Sie von jedem mon Ak (1,2,3 und 4) eine 1:3 Verdünnungsreihe her, also unverdünnt, 1:3, 1:9, 1:27, 1:81, BSS als Leerwert,
  gehen Sie dazu folgendermaßen vor:
  - Beschriften 1,5 ml Reaktionsgefäße („Eppis“) mit „1:3“, „1:9“, „1:27“, „1:81“
  - Legen Sie 400 µl BSS in jedes Eppi vor
  - pipettieren Sie 200 µl des entsprechenden unverdünnten monoklonalen Antikörpers in das Eppi „1:3“, 5-6× auf und ab pipettieren (mischen!). Dann entnehmen Sie 200 µl aus dem Eppi „1:3“ und geben es in das Eppi „1:9“. Mischen durch auf und ab pipettieren und weitere *serielle* Verdünnung nach dem gleichen Prinzip
- geben Sie in eine Reihe der 96-Loch-Mikrotiterplatten 12x 50 µl der SRBC- und in die nächste Reihe 12x 50 µl FITC-SRBC-Suspension (s. Pipettierschema unten),
- geben Sie nach dem unten angegebenen Pipettierschema von jeder Verdünnungsstufe des Ak (unverd., 1:3, 1:9, 1:27, 1:81, BSS als Kontrolle) in Doppelwerten 50 µl in die Vertiefungen der Mikrotiter-Platte,
- die Mikrotiter-Platten werden mit dem Deckel verschlossen und für 30-60 min bei 37°C inkubiert.
- Kontrollieren Sie danach das Ergebnis in den Platten:

Wo beobachten Sie Agglutination? Protokollieren Sie das Ergebnis.

Pipettierschema :

Verdünnung



Aufgabe 4 Bestimmung von Antikörpern mit der ELISA-Technik

ELISA bedeutet "enzyme linked immunosorbent assay". Es gibt verschiedene Variationen dieser Technik, die sich durch die spezifischen Erfordernisse bedingt unterscheiden. Das Prinzip besteht darin, dass eine zu messende Substanz (z.B. Antigen) mit einem spezifischen Ak reagiert, an welchen kovalent ein Enzym (Phosphatase oder meistens Peroxidase) gekoppelt ist. Die Menge des gebundenen Enzyms ist also der Menge der zu messenden Substanz proportional. Im nächsten Schritt wird das Substrat des Enzyms zugegeben. Bei gekoppelter Peroxidase (siehe Praktikum 4) wird H_2O_2 plus ein aromatisches Amin zugegeben. Die Peroxidase setzt aus H_2O_2 atomaren Sauerstoff frei, welcher das aromatische Amin (hier ABTS) oxidiert und dadurch in eine gefärbte Verbindung überführt.

Material:

- Streifen einer Mikrotiter-Platte, welcher über Nacht mit FITC-BSA beschichtet wurde. Das FITC-BSA wird dabei durch elektrostatische Kräfte festgehalten und kann nicht abgewaschen werden.
- mon Ak 1 enthaltenden Hybridomzellkulturüberstand (roter Punkt)
- Peroxidase-gekoppeltes Antiserum vom Kaninchen gegen die gesamten Maus-Immunglobuline (IgG anti IgM)
- ABTS Substrat zur Entwicklung der Enzymreaktion
- PBS mit 0,05% Detergenz (Tween)

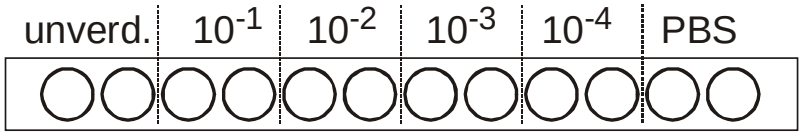
Methode:

- Stellen Sie eine Verdünnungsreihe des mon Ak 1 (roter Punkt) enthaltenden Kulturüberstandes in PBS her: 10^0 (entspricht dem unverdünnten Kulturüberstand) 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4} und negative Kontrolle (nur PBS),

  Vorgehensweise zur Erstellung der Verdünnungsreihe:
  - Beschriften Sie Eppis mit „10^{-1}“, „10^{-2}“; „10^{-3}“, „10^{-4}“ (entspricht 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000-Verdünnungen!)
  - Legen Sie 450 µl PBS in jedes Eppi vor
  - pipettieren Sie 50 µl des entsprechenden konzentrierten monoklonalen Antikörpers in das Eppi „10^{-1}“, 5-6× auf und ab pipettieren (zusätzlich dabei mit

der Pipettenspitze mischen!). Dann entnehmen Sie 50 µl aus dem Eppi „10^{-1}“ und geben es in das Eppi „10^{-2}“. Weitere serielle Verdünnung nach dem gleichen Prinzip!

- Schlagen Sie die in den Löchern der Mikrotiter-Platte befindliche Pufferlösung aus (d.h. die umgedrehte Platte mit Schwung auf ein Papierhandtuch „klatschen“) und waschen Sie 2 x mit 200 µl PBS+Tween
- geben Sie in je zwei Löcher (Doppelwerte) 100 µl einer Verdünnungsstufe,
- 30 min bei RT inkubieren, dann 2 x mit 200 µl PBS+Tween waschen,
- Zugabe des Kaninchen-anti-Maus-Immunglobulin/Peroxidase-gekoppelt (in 15 ml Röhrchen auf Eis!): 100 µl pro Loch,
- 30 min bei RT inkubieren, 3 x mit 200 µl PBS+Tween waschen und 100 µl ABTS Substratlösung zugeben,
- wenn in den negativen Kontrollen Färbung anfängt sichtbar zu werden, ist der Test beendet; Ergebnis protokollieren.
- die Streifen könnten zur genaueren Analyse in eine 96-Loch-Platte gestellt und in einem ELISA-Reader bei 405 nm gemessen werden (wird hier weggelassen!)..



Aufgabe 5 Phagozytose von GFP-exprimierenden Bakterien durch Makrophagen

Phagozyten und Antigen-präsentierende Zellen können Bakterien aufnehmen (phagozytieren), um sie zu lysieren und anschließend das Immunsystem zu informieren. In diesem Versuch soll die Phagozytose von Makrophagen im Vergleich zu Blutstammzellen, die diese Fähigkeit nicht besitzen, untersucht werden. Dazu wird das Schicksal von *green-fluorescent-protein* (GFP) exprimierenden Bakterien in Anwesenheit von Makrophagen bzw. Blutstammzellen mit dem Fluoreszenz-mikroskop untersucht.

Material:

- Zellkulturen von Makrophagen und Blutstammzellen
- Kultur von GFP-exprimierenden Bakterien (E.coli)
- Fluoreszenzumkehrmikroskop mit Kamera

Aufgabe (als Demonstrationspraktikum):

- Es werden am Mikroskop jeweils 10-30 µl der Bakterienkultur in jeweils eine der beiden Zellkulturschalen (Makrophagen und Blutstammzellen) pipettiert.
- Beobachten und dokumentieren Sie das Schicksal der Bakterien im Fluoreszenzmikroskop direkt und ca. 1 Std. nach dem Zusammenbringen von den Bakterien mit den Zellen.

Praktische Aufgaben 1 bis 5

Praktikumsgruppe:
Namen der Praktikanten:

Aufgabe 1:
Beschreiben Sie die Präparate und diskutieren Sie die Ergebnisse. Durch welche Antikörperklasse ist der Effekt wahrscheinlich vermittelt worden. Benennen Sie weitere an dieser Reaktion beteiligte Moleküle.

.....
.....
.....
.....
.....
.....

Aufgabe 2:
Beschreiben Sie die Präparate und nennen Sie mögliche molekulare Mechanismen der Rosettenbildung.

.....
.....
.....
.....
.....
.....

Aufgabe 3:

Wo beobachten Sie Agglutination? Welche Antikörper erkennen FITC bzw. SRBC-Antigen? Bestimmen Sie den Titer. Wo liegt die Prozone? Wie kann dieser Test zur Bestimmung von Blutgruppenantigenen genutzt werden?

.....
.....
.....
.....
.....
.....

Aufgabe 4:

Beschreiben Sie die Ergebnisse, indem sie für jede Antikörperkonzentration die Intensität der Färbung mit +, ++, +++, usw. protokollieren. Bestimmen sie näherungsweise den Titer. Welche Antikörperkonzentration würde man zur Bestimmung variabler Mengen des Antigens (FITC-BSA) einsetzen?

.....
.....
.....
.....
.....
.....

Vergleichen Sie die verschiedenen Antikörpernachweise der Aufgaben 1-4 und vergleichen Sie die Eigenschaften der mon Aks 1, 2, 3, 4

.....
.....
.....
.....
.....
.....

Aufgabe 5:

Beschreiben Sie die Ergebnisse, indem sie für jede Zellart das Bild im Fluoreszenzmikroskop grafisch darstellen. Bestimmen Sie, welche Zellart die Fähigkeit zur Phagozytose besitzt. Diskutieren Sie die Ergebnisse im Hinblick auf die immunologische Abwehr.

.....
.....
.....
.....

Anhang

Biochemisches Praktikum für Mediziner und Zahnmediziner

Im medizinischen Alltag wird mit einer Vielzahl von Stoffen und Zubereitungen umgegangen, die aufgrund toxikologischer, bakteriologischer, chemischer oder physikalischer Eigenschaften als **Gefahrstoffe** zu bezeichnen sind.

Zu den Lernzielen eines Biochemischen Praktikums gehört deshalb nicht zuletzt der sichere und ordnungsgemäße Umgang mit Gefahrstoffen.

Der sichere Umgang ist u. a. durch das Chemikaliengesetz (ChemG) und die Gefahrstoffverordnung (GefStoffV) geregelt. Verstöße gegen diese Gesetze sind strafbar.

Alle Beschäftigten, die mit Gefahrstoffen umgehen, müssen nach $20 GefStoffV über die auftretenden Gefahren sowie über die Schutzmaßnahmen im Umgang mit Gefahrstoffen unterwiesen werden.

Gebärfähige Mitarbeiterinnen sind zusätzlich über die für werdende Mütter möglichen Gefahren und Beschäftigungsbeschränkungen zu unterrichten (Mutterschutzgesetz)

Arbeitsmedizinische Vorsorge ist Vorraussetzung für den Umgang mit Gefahrstoffen! (Tel. Hochschularzt 3731)

Nachfolgend wird der Umgang mit Gefahrstoffen im Biochemischen Praktikum erläutert!

Umgang mit Gefahrstoffen

Inhaltsverzeichnis

1. Was ist ein Gefahrstoff
2. Erkennen von Gefahrstoffen
3. Gefahren für Mensch und Umwelt
4. Schutzmaßnahmen und Verhaltensregeln
5. Verhalten im Gefahrfall und Erste Hilfe
6. Sachgerechte Entsorgung
7. R- und S-Sätze
8. Chemikalienliste
9. Betriebsanweisungen
10. Wichtige Telefonnummern

Zusammengestellt wurden diese Unterlagen von Veit Lebrecht
Biochemisches Institut , Sicherheitsbeauftragter, CAU-Kiel

1. Was ist ein Gefahrstoff?

Zu den Gefahrstoffen gehören alle festen, flüssigen und gasförmigen Substanzen, die

a) beim Umgang (herstellen, verbrauchen, lagern, transportieren) die menschliche Gesundheit gefährden

und/oder

b) die Natur (Wasser, Boden, Luft, Klima, Pflanzen und Tiere) in ihrer Beschaffenheit gefährlich verändern können.
(z. B. Giftstoffe, Farbstoffe, Treibgase, Säuren und Laugen)

2. Erkennen von Gefahrstoffen

Gefahrstoffe werden nach den jeweils gültigen Fassungen des Chemikaliliengesetzes sowie der Gefahrstoffverordnung (entsprechend der EG-Richtlinien) gekennzeichnet.
Die Kennzeichnung ist ein wesentlicher Teil der Informationen über die Gefahreigenschaften und somit ein Hilfsmittel für den sicheren Umgang mit Gefahrstoffen.
Sie muss bei handelsüblichen Produkten folgende Informationen beinhalten:

2.1 Bezeichnung des Stoffes
(Name, Synonyme und ggf. Konzentrationsangaben)

2.2 Name des Herstellers
(Beim Hersteller können jederzeit Sicherheitsdatenblätter oder andere Stoffinformationen angefordert werden.)

2.3 R- und S-Sätze
R-Sätze sind Gefahrenhinweise („Risk“), S-Sätze sind Sicherheitsratschläge („Safe“). Bei Berücksichtigung dieser Hinweise und Ratschläge auf den Etiketten können bereits grundlegende Maßnahmen zur Verhinderung von Gesundheitsgefahren ergriffen werden. (s.a. Punkt 7)

2.4 Gefahrensymbole (Schwarze Schrift auf orangem Grund)

Die gefährliche Eigenschaft einer Substanz kann durch folgende Gefahrensymbole gekennzeichnet werden:

Sehr giftig

Sehr giftig sind Stoffe, die bereits in sehr geringen Mengen bei Einatmen, Verschlucken oder Berühren mit der Haut schwere Gesundheitsschäden hervorrufen oder zum Tode führen können.
(z. B. Cyanide, Quecksilbersalze)

Vorsicht: Jeglicher Kontakt mit dem menschlichen Körper ist zu vermeiden. Bei Unwohlsein sofort Arzt hinzuziehen!

Giftig

Giftig **sind Stoffe, die bei Einatmen, Verschlucken oder Berührung mit der Haut ernste Gesundheitsschäden hervorrufen oder zum Tode führen können.**

(z.B. Formaldehyd, Phenol, Benzol)

Vorsicht: Jeglicher Kontakt mit dem menschlichen Körper ist zu vermeiden. Bei Unwohlsein sofort Arzt hinzuziehen!

Gesundheitsschädlich

Gesundheitsschädlich **sind Stoffe, die bei Einatmen, Verschlucken oder Berührung mit der Haut Gesundheitsschäden hervorrufen können.**

(z.B. Butanol, Hydrochinon)

Vorsicht: Jeglicher Kontakt mit dem menschlichen Körper ist zu vermeiden.

Krebserzeugende, erbgutverändernde und fortpflanzungsgefähr-dende Stoffe **werden ebenfalls mit den Gefahrensymbolen T und Xn gekennzeichnet.** Beim Umgang mit diesen Stoffen ist äußerste Vorsicht geboten!

Ätzend

Ätzend **sind Stoffe, die zu einer ausgeprägten Schädigung von Haut, Augen und Schleimhäuten führen können.**

(z.B. konzentrierte Säuren und Laugen)

Vorsicht: Jeglicher Kontakt mit Augen, Haut und Kleidung ist zu vermeiden. Dämpfe nicht einatmen. Bei Unfall oder Unwohlsein sofort den Arzt hinzuziehen!

Glasbehälter nur in Kunststoffgefäßen (z. B. Eimer) transportieren.

Reizend

Reizend **sind Stoffe, die bei Berührung mit Haut, Augen oder Schleimhäuten Rötungen oder Entzündungen hervorrufen können.**

(z. B. Verdünnte Säuren / Laugen, Desinfektionsmittel)

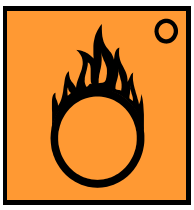
Vorsicht: Gefahr der Sensibilisierung bei Hautkontakt, Berührung mit Augen und Haut ist zu vermeiden, Dämpfe nicht einatmen!

Umweltgefährlich

Umweltgefährlich **sind Stoffe, die im Falle eines Eintritts in die Umwelt die Natur in ihrer Beschaffenheit gefährlich verändern können.**

(z. B. Anilin, Tetrachlorethan)

Vorsicht: Niemals in die Kanalisation, den Boden oder die Umwelt gelangen lassen.

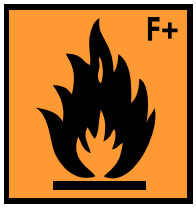


Brandfördernd

Brandfördernd **sind Stoffe, die einen Brand ohne Luftzufuhr unterhalten können und die Heftigkeit eines Brandes beträchtlich erhöhen.**

(z.B. Peroxide, Chromschwefelsäure)

Vorsicht: Jeglichen Kontakt mit brennbaren Stoffen vermeiden.



Hochentzündlich Leichtentzündlich

Hochentzündlich / leichtentzündlich **sind Stoffe, deren Gase und Dämpfe mit der Umgebungsluft explosionsfähige Gemische bilden, die bei Anwesenheit einer Zündquelle (z. B. elektrisch oder mechanisch erzeugte Funken, heiße**

Oberflächen, offenes Feuer) entzündet werden können.

Hochentzündliche Stoffe haben einen Flammpunkt* unter 0°C und einen Siedepunkt unter 36°C. (z.B. Acetaldehyd, Diethylether)

Leichtentzündliche Stoffe haben einen Flammpunkt* unter 12°C. (z.B. Aceton, Ethanol)

Vorsicht: Hochentzündliche und leichtentzündliche, flüssige Stoffe können sich bei Zimmertemperatur an der Luft auch ohne Energiezufuhr erhitzen und entzünden. Sie sind meist leichter als Wasser und bei Raumtemperatur flüchtig. Zündquellen fernhalten, möglichst Absaugung vorsehen! Gefäße niemals offen stehen lassen!

***(Der Flammpunkt ist die tiefste Temperatur, bei der ein brennbarer Stoff genügend Gase/Dämpfe entwickelt, um mit dem Sauerstoff der Umgebungsluft ein Gemisch zu bilden, das sich beim Annähern einer Zündquelle entzündet.)**

Explosionsgefährlich

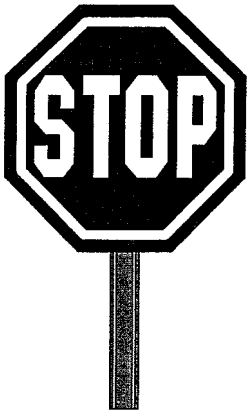
Explosionsgefährlich **sind Stoffe, die auch ohne Luftsauerstoff durch Hitze, Schlag oder Reibung zur Explosion gebracht werden können.**

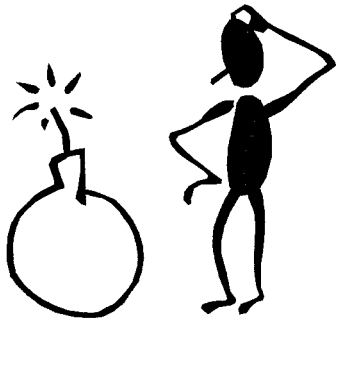
(z.B. Pikrinsäure, Ammoniumperchlorat)

Vorsicht: Schlag, Stoß, Reibung, Funkenbildung, Feuer und Hitzeeinwirkung vermeiden, Bei mechanischer Bearbeitung kühlen. Gefäße niemals offen stehen lassen!

Achtung

Auch nicht gekennzeichnete Substanzen können gefährlich wirken, gefährlich reagieren oder gefährliche Stoffe freisetzen.





Aus diesem Grunde sollte auch jede nicht gekennzeichnete und unbekannte Chemikalie wie ein Gefahrstoff behandelt werden.

3. Gefahren für Mensch und Umwelt

Der Umgang mit Gefahrstoffen und Apparaturen im chemischen Labor und Praktika ist mit zahlreichen Gefahren für die Gesundheit der dort tätigen verbunden:

3.1 Gefährdung durch Einatmung

Gase, Dämpfe, Stäube und Aerosole entfalten ihre gefährliche Wirkung, wenn sie über die Atemluft in die Lunge gelangen.

3.2 Gefährdung durch Hautkontakt

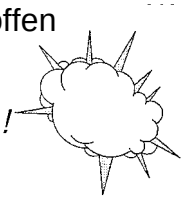
Hautresoptive Stoffe (Stoffe, die leicht die Haut durchdringen) können häufig auch ohne Warnsymptome lebensgefährliche Vergiftungen verursachen.

3.3 Gefährdung durch Verschlucken

Gefahrstoffe niemals in Lebensmittelgefäße abfüllen!

3.4 Gefährdung durch Reaktion mit anderen Stoffen

Zusammenlagerungshinweise beachten!



3.5 Gefährdung durch Umwelteinfluss

Wassergefährdende und umweltgefährliche Stoffe können die natürliche Beschaffenheit unserer Umwelt gefährlich verändern. Die wassergefährdenden Stoffe sind in drei Klassen eingeteilt:

WGK 1 (schwach wassergefährdend)

WGK 2 (wassergefährdend)

WGK 3 (stark wassergefährdend)

4. Schutzmaßnahmen und Verhaltensregeln

4.1 Alle Beschäftigten haben darauf zu achten, dass die Sicherheitseinrichtungen im Arbeitsbereich voll funktionstüchtig sind.

Dies sind z. B. Not- und Augenduschen (beide an fließendem Wasser angeschlossen!), Verbandkasten mit Verbandbuch, Feuerlöscher, Löschdecken, „Not-Aus-Schalter“, Abzüge, Bindemittel, etc.)

Jeder Beschäftigte muss sich mit den Sicherheitseinrichtungen und deren Anwendung vertraut machen.

Einrichtungen, die der Sicherheit dienen (auch Notausgänge!) dürfen nicht unwirksam gemacht oder zweckentfremdet werden.

4.2 Alle Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter habe im Arbeitsbereich für Ordnung und Sauberkeit zu sorgen.

Dies beinhaltet v. a. auch das ordnungsgemäße Abfüllen und Etikettieren von Chemikalien.

Das Abfüllen von Chemikalien in Lebensmittelbehältern ist strengstens untersagt!

Alle Beschäftigten haben darauf zu achten, dass Chemikalien nicht verwechselt werden können. Die Bezeichnung des Stoffes und die Gefahrensymbole müssen auf den Gefäßen angebracht werden.

(Warnetiketten bestellen!)

4.3 **In Arbeitsbereichen, in denen mit Gefahrstoffen umgegangen wird, darf nicht gegessen, getrunken, geraucht oder geschnupft werden. Lebensmittel aufbewahren ist strengstens untersagt.**

4.4 Beim Umgang mit Gefahrstoffen, muss ein Schutzkittel, eine Schutzbrille, geschlossenes, festes und trittsicheres Schuhwerk und „geeignete“ Schutzhandschuhe getragen werden.

(Säure/Lauge-beständige Schutzhandschuhe “Camprene“ im Fertig-vorrat bestellen!)

Können Gefahrstoffe in gefährlicher Konzentration unerwartet auftreten, sind geeignete Atemschutzmasken bereitzuhalten!

Zu beziehen beim Sicherheitsbeauftragten, Tel: 2220

4.5 Defekte oder beschädigte Geräte bzw. Apparaturen sind sofort außer Betrieb zu nehmen und als unbrauchbar zu kennzeichnen, bzw. die Reparatur zu veranlassen.

(Um-/Absetzungsantrag (für zu entsorgende Altgeräte) an das Dez. 190 schicken

Auf Prüfnachweise (z.B. TÜV-Plaketten) ist zu achten!

(Abgelaufene TÜV-Plaketten sofort der Medizintechnik (Tel. 4004) melden!)

4.6 Die einwandfreie, lufttechnische Funktion eines Abzuges muss durch eine selbsttätig wirkende Einrichtung überwacht sein. Im Fehlerfall muss eine

optische und eine akustische Alarmierung erfolgen.

(Grüne Kontrollleuchte und z.B. Wollfaden)

Bei Arbeiten unter dem Abzug ist der Frontschieber so weit wie möglich zu schließen!

Achtung: Die Betriebszeiten der Abzüge sind unterschiedlich und laufen meist nicht über Nacht! Für eine Inbetriebnahme außerhalb der Betriebszeiten die Technische Störungsannahme (Tel.: 2222) anrufen. (Dies gilt auch für die Klimaanlage)

4.7 Gefahrstoffe sind so aufzubewahren oder zu lagern, dass sie die menschliche Gesundheit und die Umwelt nicht gefährden.

- **Behältnisse mit Gefahrstoffen dürfen nur bis zu einer solchen Höhe aufbewahrt werden, dass sie noch sicher entnommen und abgestellt werden können.**
- **Im Labor dürfen nicht mehr als 10 l brennbare Flüssigkeiten aufbewahrt werden. Kühlschränke und Kühltruhen in Normalausführung müssen zur Lagerung von brennbaren Flüssigkeiten umgerüstet werden!**
- **Sehr giftige und giftige Substanzen sind unter Verschluss aufzubewahren. Alle Gefahrstoffe müssen vor einem unmittelbaren Zugriff von Betriebsfremden geschützt sein.**

  (Räume beim Verlassen abschließen!)
- **Gefahrstoffe, die gesundheitsgefährdende Dämpfe abgeben, sind an dauerabgesaugten Orten aufzubewahren. (Nicht die Arbeits-flächen der Abzüge zustellen, Chemikalienschrank nutzen!)**
- **Dewardgefäße (Vakuummantelgefäße) aus Glas und andere Glasgefäße gleichen Wirkungsprinzips müssen mit einem Schutzmantel (z.B. Überziehen mit Kunststoff) ausgerüstet oder auf andere Weise gegen die Folgen einer Implosion gesichert sein.**
- **Auslaufgefährdete Stoffe sind durch Auffangwannen zu sichern.**

Zusammenlagerungshinweise in den Betriebsanweisungen oder Sicherheitsdatenblättern beachten!

(Zu beziehen von dem Sicherheitsbeauftragten, Tel: 2220)

4.8 Labortüren geschlossen halten!

Offenstehende Türen ziehen unkontrollierbare Luftströmungen nach sich. Die Klimaanlage funktioniert nur richtig, wenn die Türen geschlossen sind. (Das Gefühl, dass es bei offener Türe kühler oder wärmer sei, ist objektiv falsch)

4.9 Vor der Arbeit mit Gefahrstoffen sind die sich in unmittelbarer Nähe aufhaltenden Personen zu unterrichten, damit auch von ihnen die notwendigen Schutzmaßnahmen getroffen und eingehalten werden können.

Dies gilt insbesondere, wenn mehrere Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter gleichzeitig einen Abzug benutzen.

4.10 Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter, die mit der Durchführung von Versuchen betraut sind, dürfen ihren Arbeitsplatz nur dann verlassen, wenn eine dauernde Überwachung der Versuche nicht erforderlich ist oder wenn ein anderer, der über dien Ablauf des Versuchs unterwiesen ist, die Überwachung übernimmt.

4.11 Haben sich gefährliche Stoffe in der Luft am Arbeitsplatz angesammelt, sind Messungen zu veranlassen, um festzustellen, ob die Grenzkonzentrationen (MAK-Werte) für Gefahrstoffe überschritten sind.

Der MAK-Wert ist die höchstzulässige Konzentration eines Stoffes (Gas, Dampf oder Schwebstoff) in der Luft am Arbeitsplatz, welche die Gesundheit der Beschäftigen nicht beeinträchtigt. Dies gilt auch bei wiederholter und längerfristiger, in der Regel täglich 8-stündiger Exposition, jedoch bei Einhaltung einer durchschnittlichen Wochenarbeitszeit von 40 Stunden.

(Messungen werden von der Abteilung Sicherheitsingenieur (Tel: 1550)

4.12 Bei Betriebsschluss sind die Arbeitsplätze zu sichern

(z.B. schließen der Gas- und Wasserhähne, ziehen der Netzstecker, verschließen der giftigen Chemikalien, Licht löschen etc.).

5. Verhalten im Gefahrfall

Notruf: 112

Notrufnummer für Feuer / Unfall von jedem Telefon des Universitätsklinikums!

- **Bei Notfällen durch elektrischen Strom ist sofort der „Not-Aus-Schalter“ zu betätigen.**
- **Bei Verschüttung von flüssigen Gefahrstoffen Aufsaugmittel verwenden. (Im Arbeitsbereich muss ein Vorrat an Bindemitteln bereitgehalten werden!)**

  Bei Verschütten großer Mengen ätzender Flüssigkeiten: Raum verlassen, Türen schließen und Notruf betätigen.
- **Bei Störungen an den Abzügen oder der Klimaanlage ist die technische Störungsannahme (Tel.: 2315) zu verständigen.**

Jeder Beschäftigte muss vor Arbeitsbeginn wissen, wo sich die „Erste-Hilfe-Einrichtung“ befinden! Personenschutz geht immer vor Sachschutz!

Bei allen Unfällen ist das Aufsichtspersonal und die sich im Arbeitsbereich aufhaltenden Personen zu informieren!

Erste Hilfe

Auf Selbstschutz achten!

Arzt verständigen!

Benetzte Kleidungsstücke sofort ausziehen.

Mit Gefahrstoffen in Berührung gekommene Körperstellen sind sofort gründlich (mind. 10 min) unter fließendem Wasser abzuspülen.

Betroffene Personen aus der Gefahrenzone entfernen.

Nach Einatmen von gesundheitsgefährdenden Stoffen umgehen für Frischluftzufuhr sorgen.

Nach verschlucken von Gefahrstoffen viel Wasser trinken lassen.

Bei ätzenden Substanzen erbrechen vermeiden!

Vorsicht: Gesundheitsgefahren können auch erst nach Stunden auftreten!

6. Sachgerechte Entsorgung

Es ist verboten, Chemikalien und Lösemittel, auch Kleistmengen oder Behälter mit Restanhaftungen, über den Hausmüll oder das Abwasser zu entsorgen.

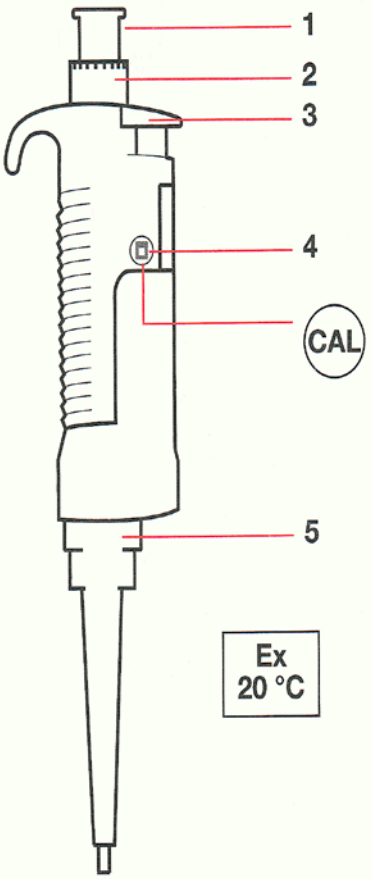
Zur sachgerechten Entsorgung nur Originalbehälter (z.B. Merck, Sigma) oder bereitgestellte Entsorgungskanister verwenden.

Spitze, scharfe oder zerbrechliche Gegenstände dürfen nur in stich- und formfeste Behältnisse gegeben werden.

Sammelbehälter für Gefahrstoffe sind im Arbeitsbereich so aufzubewahren, dass sie die übliche Arbeit nicht beeinträchtigen.

Fragen zur sachgerechten Entsorgung sind mit dem Sicherheitsbeauftragten (Tel: 2220) abzusprechen.

Bedienungsanleitung für Eppendorf Pipetten



1 Bedienknopf
Erster Anschlag (Messhub), das aufgenommene Volumen wird abgegeben.
Zweiter Anschlag (Überhub), der in der Spitze verbliebene Flüssigkeitsrest wird abgegeben.

2 Einstellring
Zur Einstellung des Volumens
Fix-Volumen-Pipette: Nur zur Justage.

3 Abwurfknopf
Spitzenabwurf.

4 Justageöffnung
mit darüberliegendem Kalibriersiegel zum Einstecken des Schlüssels bei der Justage.

5 Abwurfhülse
Zur Entnahme aus langen Gefäßen lässt sich die Abwurfhülse bei gedrücktem Abwurfknopf abziehen.

Gentechnologische Arbeiten

S1 **Betriebsanweisung** **Stand 20.01.2015**

Geltungsbereich: Biochemie-Altbau, Raum 17

Projektleiter: Prof. Dr. S. Rose-John, Dr. J. Scheller **Notruf:** 0-112

BBS: Dr. Jon Falk, Tel.4234 **Ersthelfer:** Veit Lebrecht, Tel. 2220

Betriebsarzt: Dr. Ralf Priebe, Tel. 3731 **Erste-Hilfe-Kasten:** Praktikumsraum

GEFAHREN UND GEFAHRENBEZEICHNUNG

BIO I

Gentechnische Arbeiten der Sicherheitsstufe S1

Der Sicherheitsstufe 1 sind gentechnische Arbeiten zuzuordnen, bei denen nach dem Stand der Wissenschaft und bei Einhalten der in dieser Betriebsanweisung beschriebenen Verhaltensregeln nicht von einer Gefahr für die Gesundheit von Menschen, Tieren, Pflanzen sowie der sonstigen Umwelt auszugehen ist.

SCHUTZMASSNAHMEN UND VERHALTENSREGELN

- Tätigkeiten mit gentechnisch veränderten Organismen der **Risikogruppe 1** dürfen nur im gentechnischen Labor der **Sicherheitsstufe 1** (oder höher) und von geeigneten und jährlich unterwiesenen Personen durchgeführt werden. Weitergehende Vorschriften (Gefahrstoffverordnung, Mutterschutzgesetz etc.) können in Raum135 1. OG eingesehen werden.

- Im Labor geschlossenen Laborkittel, festes und geschlossenes Schuhwerk sowie Schutzbrille tragen.
- Zum Pipettieren ausschließlich Pipettierhilfen benutzen. Nicht Mundpipettieren!
- Aerosolbildung vermeiden; Türen der Arbeitsräume während der Arbeiten geschlossen halten.

- Spritzen, Kanülen und Skalpelle sollen nur wenn unbedingt nötig benutzt werden. Benutzte Kanülen direkt in die Kanülenabfallbehälter geben; nie in die Schutzhüllen zurückstecken.
- Arbeitsplatz aufgeräumt und sauber halten.
- Nach Beendigung der Arbeiten und vor Verlassen des Arbeitsplatzes Hände desinfizieren und erst danach mit Wasser und Reinigungsmittel waschen. Anschließend Hautpflege gemäß Hautschutzplan vornehmen.

- Im Labor nicht Essen, Trinken, Rauchen, Schnupfen, Kaugummi kauen oder Kosmetika auftragen; keine Nahrungs- und Genussmittel sowie Kosmetika aufbewahren.
- Identität und Reinheit der Organismen ist in regelmäßigen Abständen zu prüfen.
- Ungeziefer und Überträger von GVO sind in geeigneter Weise zu bekämpfen.

VERHALTEN IM GEFAHRFALL

- Bei Freisetzung in großer Menge und Konzentration (z.B. Verschütten, Bruch einer Kulturflasche) Mitarbeiter warnen und den Projektleiter und den Beauftragten für die biologische Sicherheit sofort informieren.
- Kontaminierte Gegenstände oder Oberflächen sofort in geeigneter Weise reinigen. Danach mit Flächendesinfektionsmittel desinfizieren; Einwirkzeiten beachten.
- Zum Wischen und Aufsaugen geeignetes Material (z.B. Zellstoff) verwenden.

ERSTE HILFE

- Offene Wunde gründlich ausspülen oder unter Aufsicht ausbluten lassen. Desinfektion mit Wunddesinfektionsmittel.
- Bei Spritzer ins Auge mit der Augendusche intensiv spülen (10 min). Augenarzt aufsuchen!
- Verletzungen sind dem Projektleiter und dem BBS unverzüglich zu melden und in das Verbandbuch einzutragen.
- Bei intensivem Kontakt (z.B. Verschlucken, Inkorporation durch Verletzungen) Arzt aufsuchen. - Ggf. Notarzt.
- Ersthelfer und Betriebsarzt benachrichtigen.

SACHGERECHTE ENTSORGUNG

GVO

Abfälle, die gentechnisch veränderte Organismen enthalten, sind zu kennzeichnen („GVO“) und vor

Verlassen der Gen-Anlage vorzugsweise zu autoklavieren, andernfalls mit Desinfektionsmitteln zu inaktivieren.
Autoklav im Altbau Biochemie, 1. Etage , Raum : 111

Veranstaltungsordnung zum Biochemischem Praktikum ab SS2012

Praktikumsordnung

1. Die durch das Studentensekretariat vorgenommene Gruppeneinteilung gilt ebenfalls für die Biochemie und ist für alle Semester verbindlich. Bitte entnehmen Sie die Praktikumstage den ausgehängten Plänen. Versäumte Praktika können grundsätzlich nur bei Vorlage eines ärztlichen Attestes nach Entscheidung des Praktikumsleiters nachgeholt werden. Tauschen zwischen Gruppen ist grundsätzlich nicht möglich.
2. Jede/r Student/in erhält an seinem/ihrem ersten Seminartermin einen Laufzettel für die Praktika und die dazugehörigen Seminare. Der Laufzettel verbleibt in der Hand des Studenten. Die erfolgreiche Teilnahme an Praktikum und Seminar wird von dem jeweiligen Praktikumsleiter / Seminarleiter auf diesem Laufzettel bescheinigt. Der Laufzettel gilt als Nachweis für die erfolgreiche Teilnahme an den Praktika und Seminaren. Der/die Student/in haftet selber für seinen Laufzettel.
3. Das Praktikum beginnt pünktlich um 13.30 Uhr. Zu spät Kommende werden nicht mehr eingelassen. Das Tragen eines Kittels als Schutzbekleidung ist obligatorisch, eine Teilnahme am Praktikum ohne Kittel ist nicht gestattet. Rauchen, Essen und Trinken in den Kursräumen ist untersagt. Auf die dringende Einhaltung der Sicherheitsbestimmungen beim Umgang mit Chemikalien und Experimentiermaterial wird hingewiesen.
4. Jeder Teilnehmer muss nach Beendigung seiner Aufgaben den Arbeitsplatz säubern und aufräumen.
5. Jeder Kursteilnehmer führt ein Protokoll, in dem die Versuchsergebnisse eingetragen werden. Ein ordnungsgemäßes Protokoll ist Voraussetzung für das Bestehen der praktischen Testate.

Testatordnung und Bestehensgrenze für das Biochemiepraktikum für Studierende der Human- und Zahnmedizin

1. Das Testat wird unmittelbar im Anschluss an die Durchführung der praktischen Übung durch den zuständigen Gruppenassistenten erteilt. Die Teilnahme am Biochemischen Praktikum gilt als regelmäßig und erfolgreich, wenn alle Testate erteilt wurden und nicht mehr als ein Termin (entschuldigt) versäumt wurde.
2. Zur Erfolgskontrolle werden zwei “Multiple choice” Klausuren geschrieben. Bei der ersten Klausur werden 30 Fragen, bei der zweiten 35 gestellt. Jede richtig beantwortete Frage wird mit einem Punkt bewertet, so dass insgesamt maximal 65 Punkte erreicht werden können. Zur Ausgabe des Leistungsnachweises müssen dabei mindestens 18 in der ersten und mindestens 21 Punkte in der zweiten Klausur erreicht werden, mit der Einschränkung, dass am Praktikum regelmäßig und mit Erfolg teilgenommen wurde. Die Teilnahme an den Klausuren ist Pflicht. Unentschuldigte Nichtteilnahme wird als nicht bestandener Versuch gewertet.
3. Wird die Mindestpunktzahl 18 bzw 21 nicht erreicht, findet unter der Bedingung, dass
A) die Klausuren geschrieben wurden und
B) am Praktikum regelmäßig und mit Erfolg teilgenommen wurde

jeweils eine Wiederholungsklausur mit ebenfalls 30 bzw. 35 Fragen statt. Zur Ausgabe des Leistungsnachweises müssen dabei mindestens 18 in der ersten und mindestens 21 Punkte in der zweiten Klausur erreicht werden. Die Klausuren dürfen jeweils maximal 3-mal wiederholt werden. Es gelten die Bedingungen der Studienordnung.

4. Das Direktorium des Biochemischen Institutes behält sich vor, dass in besonderen Härtefällen Studierende zu einer Nachprüfung zugelassen werden können.

Veranstaltungsordnung zu den Biochemie Seminaren für Studierende der Humanmedizin ab SS 2012

1. Seminargruppen und Praktikumsgruppen sind **identisch (siehe Punkt 1 Praktikumsordung).**

Die Seminarthemen entnehmen Sie bitte den ausgehängten Plänen (Biochemie-Altbau bzw. Internet). Ein Tauschen der Gruppen ist prinzipiell nicht möglich. Wer ein Seminar versäumt, muss ein ärztliches Attest vorlegen. In diesem Falle wird das Seminar nicht an einem anderen Tag nachgeholt und es liegt in der Verantwortung des Studenten, den versäumten Lehrstoff nachzuholen.

2. Erfolgskontrolle der Biochemie Seminare für Humanmediziner

Voraussetzung für den Leistungsnachweis ist die **aktive** Teilnahme an allen Seminaren im 2., 3. und 4. Semester und das Bestehen der Seminarklausur im 3. Semester. Die Klausur gilt als bestanden wenn mindestens 21 Punkte von 35 möglichen erreicht werden.

3. Das Direktorium des Biochemischen Institutes behält sich vor, dass in besonderen Härtefällen Studierende zu einer Nachprüfung zugelassen werden können.